



Titre: Planification expérimentale dans la modélisation métabolique des cellules CHO
Title: cells CHO

Auteur: Adrien Turmo
Author:

Date: 2016

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Turmo, A. (2016). Planification expérimentale dans la modélisation métabolique des cellules CHO [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal].
Citation: PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/2246/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/2246/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Mario Jolicoeur, & Balasubrahmanyam Srinivasan
Advisors:

Programme: Génie chimique
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

PLANIFICATION EXPÉRIMENTALE DANS LA MODÉLISATION MÉTABOLIQUE DES
CELLULES CHO

ADRIEN TURMO

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)

AOÛT 2016

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

PLANIFICATION EXPÉRIMENTALE DANS LA MODÉLISATION MÉTABOLIQUE DES
CELLULES CHO

présenté par : TURMO Adrien

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. DE CRESENZO Gregory, Ph. D., président

M. SRINIVASAN Bala, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. JOLICOEUR Mario, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. HENRY Olivier, Ph. D., membre

REMERCIEMENTS

J'aimerais en premier remercier les Professeurs Balasubrahmanyam Srinivasan et Mario Jolicoeur, qui m'ont proposé ce sujet de recherche et qui m'ont beaucoup aidé dans son accomplissement. Ils m'ont tout les deux beaucoup soutenu et ont été très compréhensifs avec moi. J'ai beaucoup appris grâce à eux et les remercie pour ces deux années et demie.

Je voudrais remercier aussi Edwige, qui m'a formé à la culture de cellules, qui à toujours été présente quand j'avais besoin d'elle, et pour les soirées MAD JAK. Je voudrais aussi remercier Éric qui m'a aidé pour mes tests de respirations, et Jingkui, qui m'a conseillé pour les extractions. Merci aussi à tout les autres du labo, avec qui j'ai passé de bons moments, bien que je n'ai été que peu présent parmi eux.

J'aimerais remercier mes parents et mon frère, qui m'ont été d'un grand soutien pendant ces trois années et qui ont toujours cru en moi. Je veux remercier Julien, dit Juju, qui a réussi à me supporter comme colocataire depuis notre arrivé à Montréal, et Fanny qui a supporté ma mauvaise humeur. Un grand merci à Erwan qui m'a fait passé des soirée (im)mémorables. Un grand merci général aux membres du PUB, sans qui j'aurai probablement raté mon séjour. Merci à tout mes amis de France, en particulier Niels, Mathilde, Audrey et Alex, qui sont venu me rendre visite.

RÉSUMÉ

Bien que les cellules CHO soient principalement utilisées par l'industrie pharmaceutique actuellement pour produire la majeure partie des protéines recombinantes, ces bioprocédés présentent toujours des coûts de production élevés. Aussi, plusieurs approches sont étudiées en recherche pour améliorer les procédés de culture et de production. Mais que cela soit par l'amélioration des milieux de culture, de la génétique de la cellule ou encore des appareillages utilisés, il semble essentiel de comprendre le comportement des cellules dans leur environnement de culture et de production. De multiples études abordent déjà cette problématique, par analyse de flux métabolique et/ou par la modélisation du comportement cellulaire en lien avec leur environnement. Dans ce contexte, un modèle dynamique peut prétendre à mieux décrire le comportement du métabolisme cellulaire au cours du temps, permettant une identification des étapes de croissance, de production, de mort cellulaire etc. Ainsi, notre groupe a préalablement développé un tel modèle du métabolisme primaire des cellules CHO. Se concentrant sur le métabolisme central du carbone, ce modèle inclut les cinétiques de réaction et de régulation des multiples flux métaboliques considérés. Le modèle comportant un très grand nombre d'inconnues par rapport à ses variables, il est très sous-déterminé et ainsi est très dépendant des mesures intra et extracellulaires obtenues pour le calibrer. Cependant les expérimentations sur les cellules CHO sont coûteuses et prennent du temps, il convient donc de s'assurer que des mesures supplémentaires améliorent en effet notre modèle. Dans ce contexte, la planification expérimentale est très efficace, car elle fournit une méthode qui a pour but de déterminer précisément une ou plusieurs expériences avec des paramètres d'entrée (composition du milieu, température etc.) identifiés et contrôlés, et dont les mesures expérimentales permettent de réduire l'erreur de détermination sur les paramètres calculés du modèle.

Ce mémoire présente ainsi le travail de planification expérimentale effectuée sur une lignée de cellules CHO haute productrice. À partir du modèle déjà développé, une analyse de sensibilité a été faite sur l'ensemble des paramètres du modèle dans le but d'identifier ceux qui influencent le plus la qualité du modèle dans sa globalité. Ces paramètres sont ensuite re-identifiés à partir des données déjà produites, pour s'assurer que le modèle simule correctement. Par la suite une première étude a révélé que l'oxygène est un facteur de contrôle très intéressant pour une planification expérimentale, mais il convient de confirmer la bonne modélisation du

comportement cellulaire vis-à-vis de celui-ci. Ainsi des expériences de respiration cellulaire ont permis de déterminer l'affinité des cellules CHO à l'oxygène et leur résistance à un milieu hypoxique. Les cellules présentent ainsi une haute affinité à l'oxygène et peuvent rester longtemps en hypoxie sans mourir.

La grande affinité des cellules à l'oxygène nous indique alors qu'une coupure d'oxygène pendant la croissance d'une culture de cellules est un bon moyen de créer une perturbation suffisante pour générer de nouvelles données intéressantes. En effet l'idée de la planification expérimentale est de trouver comment générer des données autres que celles déjà utilisées précédemment, permettant ainsi de modéliser correctement le maximum de cas possibles. Ainsi la planification expérimentation finale a été effectuée sur une simulation de coupure d'oxygène avec la durée et le temps de début de cette coupure comme paramètres d'entrées. Il a été révélé que le temps de la coupure devra être autour de quatre heures, et que la coupure est plus efficace pendant la phase exponentielle.

ABSTRACT

Despite the fact that CHO cells are the main platform currently used by pharmaceutical industry to produce most of the recombinant proteins, the bioprocesses used are still costly. Also, many approaches have been studied in order to improve the culture and production processes. But by either the improvement of culture medium, cell genetic modifications or machinery used, it seems essential to understand the cells behavior in their culture and production environment. Multiple studies have already taken on this subject through the metabolic flux analysis and their modeling in relationship with their environment. In this context, a dynamical model could better describe the cellular metabolism through time, allowing an identification of different phases such as growth, production, apoptosis. Therefore our group previously developed such a model, describing the central carbon metabolism of CHO cells. This model includes the reactions kinetics and regulations of the multiple metabolic fluxes it simulates. The model possesses a large number of unknown parameters compared to its variables, it is largely underdetermined and therefore very dependent on collected data. But experiments on CHO cells are costly and time-consuming, it is then important to make sure that supplementary measures will be beneficial for the model. In this context experimental planning is very efficient, because it describes a way to precisely determine one or more experiments which input parameters (medium composition, temperature, etc.) are identified and controlled, and from which we can extract experimental measures allowing to reduce the fitting error on calculated model parameters.

This dissertation presents the work done on the experimental planning applied to a high producing CHO cell line. From the already developed model, a sensitivity analysis has been done on the whole set of parameters in order to identify the ones that have the most influence on the global quality of the model. These parameters are then identified again from available data, to make sure that the model correctly fits the data. Next a first study revealed that oxygen is an interesting control factor for an experimental planning, but it is important to make sure the good modeling of the cell behavior towards oxygen. Therefore respiratory experiments were conducted and allowed to determine cells oxygen affinity and their resistance to an hypoxic environment. The cells have a high affinity to oxygen and can last long without it and not die.

The cells high oxygen affinity reveals that an oxygen deprivation during cell growth is a good way to entail a sufficient perturbation that will generate new interesting data. Indeed the idea

behind experimental planning is to generate new data that differ from those previously used, and therefore allowing to correctly model different culture conditions. With this in mind, the final experimental planning has been implemented with the time and duration of an oxygen deprivation as input parameters. It has been found that a four-hours-long cut during the exponential phase is the most efficient way to improve the model.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XII
LISTE DES ANNEXES.....	XIV
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	4
2.1 La production des anticorps monoclonaux.....	4
2.1.1 Les cellules de mammifère.....	4
2.1.2 Les cellules CHO	5
2.2 Le métabolisme des cellules CHO	6
2.3 Modélisation du métabolisme	9
2.3.1 Méthodes reposant sur le régime pseudo-stationnaire	9
2.3.2 Méthodes dynamiques.....	12
CHAPITRE 3 MATÉRIEL ET MÉTHODES	16
3.1 Culture cellulaire	16
3.2 Tests de respiration.....	16
3.3 Modélisation mathématique	17
3.4 Analyse de sensibilité.....	18
3.5 Estimation des paramètres et intervalles de confiance.....	19

3.6	Planification expérimentale	20
CHAPITRE 4 RÉSULTATS ET DISCUSSION		22
4.1	Sélection des paramètres d'intérêt - application d'une analyse de sensibilité.....	22
4.2	Identification des paramètres et intervalles de confiance.....	25
4.3	Planification expérimentale statique	26
4.4	Planification expérimentale dynamique - variation de l'oxygène dissous	27
4.4.1	Identifier K_{O_2} - tests de respiration.....	28
4.4.2	Viabilité cellulaire en absence d'oxygène	30
4.4.3	Planification expérimentale finale et résultats attendus	31
CHAPITRE 5 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS		34
BIBLIOGRAPHIE		36
ANNEXES		65

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4-1 : Valeurs de la fonction objectif pour les 12 paramètres les plus influents..	24
Tableau 4-2 : Valeurs des cinq paramètres sélectionnés et leur intervalle de confiance respectif	26
Tableau 4-3 : Résultats des tests de viabilité.....	30
Tableau 4-4 : Les intervalles de confiance en pourcentage	33

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1 : Métabolisme central du carbone.....	7
Figure 3-1 : Réseau métabolique simulé par le modèle	18
Figure 4-1 : Simulation du modèle avec les paramètres d'intérêts identifiés	25
Figure 4-2 : L'évolution du déterminant de la matrice Hessienne en fonction de la valeur initiale de EGLN (gauche) et d'oxygène dissous (droite).....	27
Figure 4-3 : Données expérimentales brutes des expériences de respiration (A) et les valeurs calculées (B).....	29
Figure 4-4 : Valeurs du déterminant de la matrice Hessienne en fonction de la durée de la coupure en oxygène.....	31
Figure 4-5 : Valeurs du déterminant de la matrice Hessienne de la fonction de coût en relation avec le temps de commencement de la coupure	32

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

μ_{\max}	Taux spécifique de croissance maximal des cellules (h^{-1}) mettre les unités
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
CHO	Cellules d'ovaire de hamster chinois (<i>Chinese Hamster Ovary</i>)
E	Énergie d'activation
FADH	Flavine adénine dinucléotide (forme semiquinone)
FADH ₂	Flavine adénine dinucléotide (forme hydroquinone)
FBA	<i>Flux Balance Analysis</i>
K _{O₂}	Constante d'affinité à l'oxygène
MCA	<i>Metabolic Control Analysis</i>
MFA	<i>Metabolic Flux Analysis</i>
MPA	<i>Metabolic Pathway Analysis</i>
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NADP ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme oxydée)
NADHP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
DO	Oxygène dissous
OUR	Taux de consommation en oxygène (<i>oxygen uptake rate</i>)
pO ₂	Pression partielle d'oxygène
qO ₂	Taux de consommation spécifique en oxygène
R	Constante des gaz parfait

T	Température
t	Temps
X	Concentration cellulaire

LISTE DES ANNEXES

Annexe A - Tests de respiration - correction de temperature	45
---	----

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Plusieurs types de maladies sont aujourd'hui traités par des protéines recombinantes, tels que certains cancers, les maladies cardio-vasculaires, l'infertilité ou encore l'arthrite (Jayapal K.P. et al., 2007), pour n'en citer que les exemples majeurs. La complexité de ces protéines les oblige à être synthétisées par des organismes biologiques au lieu d'être directement créées chimiquement. Ces organismes producteurs peuvent aller des bactéries aux cellules de mammifères et bien qu'ils ne produisent pas naturellement tous les produits dont nous avons besoin, grâce aux manipulations génétiques, cela devient possible. La croissante compréhension des systèmes biologiques a entraîné la volonté de les modifier. Depuis les premiers succès en 1972 et 1973 (Jackson D.A. et al., 1972, Cohen S.N. et al., 1973), la première autorisation sur le marché d'une molécule recombinée d'insuline en 1982 par la FDA (Kinch M.S., 2015), aujourd'hui plus de 400 molécules produites par cette technique sont sur le marché à travers le monde (Sanchez-Garcia L. et al., 2016). Parmi ces protéines, les anticorps monoclonaux sont le secteur en plus grande expansion et représente à lui seul 25.6% de part de marché des produits biopharmaceutiques aux États-Unis (Kuystermans D. et Al-Rubeai M., 2014) et la majorité d'entre eux sont produites par les cellules CHO (Ferrer-Mirailles N. et al. 2009)

Ces cellules sont l'un des organismes les plus étudiés aujourd'hui, car malgré l'augmentation des taux de production depuis plusieurs années, les objectifs sont d'améliorer la qualité et les capacités de production et de réduire les coûts. Dans ce contexte, plusieurs solutions sont possibles telles que la modification du milieu de culture (Fox S., 2004) ou l'incorporation de modifications génétiques (Brown A.J. et James D.C., 2016). Mais de telles méthodes sont coûteuses et une mauvaise compréhension du métabolisme cellulaire peut réduire des expériences à l'échec. C'est dans l'objectif de mieux comprendre le métabolisme cellulaire que différentes méthodes ont été développées pour l'étudier. Le développement d'un modèle mathématique permet alors de comprendre les caractéristiques spécifiques, sous différentes conditions, à partir de données déjà existantes. Plusieurs de ces méthodes ont déjà été utilisées sur les cellules CHO, telles que l'analyse des flux métaboliques (MFA), la "flux balance analysis" (FBA) ou encore la "metabolic pathway analysis" (MPA) (Zamorano F. et al, 2016). Ces méthodes se concentrent sur

l'études des flux métaboliques et ont beaucoup contribués à la compréhension et à l'amélioration des taux de production des cellules CHO.

Mais l'inconvénient de ces modèles est qu'ils se basent sur des conditions quasi-stationnaires de comportements cellulaires et restent ainsi très limités en terme de prédiction. C'est dans cette optique que notre équipe a développé un modèle cinétique pour des cellules de plantes (Cloutier et al. 2007), qui a ensuite été adapté pour décrire le métabolisme de plusieurs lignées de cellules CHO (Ghorbaniaghdam A. et al. 2014), et a servi à la comparaison de conditions de culture, en particulier entre les modes cuvée et cuvée alimentée (Robitaille J. et al. 2015). Ce modèle est très récent et sa capacité prédictive reste à prouver. En effet le très grand nombre de paramètres rend l'identification peu fiable et il faut alors mettre en place des méthodes pour améliorer notre modèle. Mais l'acquisition de nouvelles données est coûteuse et prend du temps. Une planification expérimentale permet alors de s'assurer de l'obtention de données utiles à l'amélioration du programme de modélisation.

Objectifs et méthodologie

Le développement d'un modèle purement dynamique est très récent dans le domaine de la modélisation des cellules CHO. De plus, la grande quantité de variables et la difficulté d'obtenir des données font que les erreurs peuvent s'accumuler et réduire la capacité prédictive du modèle. Ainsi, à partir du modèle précédemment développé par notre équipe (Ghorbaniaghdam A. et al. 2013), l'objectif principale de ce mémoire est de donner un plan expérimental qui aboutira à l'obtention de données qui permettrons de réduire l'erreur d'identification sur certains paramètres, augmentant ainsi la confiance dans notre modèle. Plusieurs étapes intermédiaires ont alors été nécessaires pour aboutir à ce résultats. Premièrement les paramètres les plus sensibles du modèles ont été déterminés et cinq d'entre eux ont été choisis. Puis ceux-ci et leurs intervalles de confiance ont été calculés à partir des données disponibles. Une première planification expérimentale sur un niveau constant en oxygène et sur la valeur initiale en glutamine à été conduite. Enfin, une planification expérimentale finale s'est portée sur le temps et la durée d'une coupure en oxygène, après avoir calculé l'affinité des cellules à ce dernier, et vérifier leur viabilité en milieu hypoxique.

Organisation du mémoire

Ce mémoire est divisé en trois parties. La première partie est la revue de littérature concernant la production des anticorps monoclonaux par les cellules de mammifère avec un intérêt particulier sur les cellules CHO. Le métabolisme des cellules sera présenté ainsi que les méthodes de modélisation. La seconde partie est le cœur du travail effectué et présente la méthode de planification expérimentale appliquée au modèle dynamique développé pour une lignée haute productrice de cellules de CHO. Le dernier chapitre sert de conclusion et de recommandation pour de futurs travaux.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

Dans ce chapitre, nous présentons une revue de la littérature générale sur la problématique reliée au développement de bioprocédés de production de protéines thérapeutiques recombinantes par les cellules CHO, l'état de l'art spécifique à l'objectif poursuivi dans ces travaux de maîtrise étant présenté au chapitre sur les résultats (Chapitre 3). Une première partie s'attardera aux considérations de l'industrie pour la production d'anticorps monoclonaux de manière générale, puis pour le cas spécifique des cellules CHO. Ensuite, nous verrons comment est organisé le métabolisme des cellules CHO, en particulier le métabolisme central du carbone, incluant la glycolyse, la voie des pentoses phosphates, le métabolisme des acides aminés et de l'énergétique. Enfin, nous nous intéresserons aux approches cherchant à optimiser et maximiser les bioprocédés de production à base de cellules CHO par l'analyse et à la modélisation du métabolisme cellulaire.

2.1 La production des anticorps monoclonaux

Les maladies cardio-vasculaires et les cancers sont les principales causes de décès dans nos populations occidentales vieillissantes. La demande en traitements novateurs efficaces et non invasifs ne cesse donc d'augmenter. Les protéines recombinantes, en particulier les anticorps monoclonaux, sont ainsi de plus en plus utilisées car elles ont démontré être très efficaces dans diverses approches de traitement de ces maladies et de bien d'autres également (Jayapal K.P. et al., 2007). De plus, la valeur du marché pour ce type de traitement ne cesse d'augmenter (<http://www.bccresearch.com>), et l'industrie pharmaceutique s'intéresse fortement à la diminution des coûts, du temps de production et à l'augmentation de la qualité des protéines produites, pour limiter les effets secondaires, par divers moyens tels que par modifications génétiques de lignées cellulaires et par l'optimisation des protocoles de culture en bioréacteurs.

2.1.1 Les cellules de mammifère

Il existe plusieurs plateformes cellulaires permettant de produire des protéines recombinantes, telles que les cellules de plante, et les levures et bactéries (Chen R. 2012, Lauersen et al. 2015). Cependant, les cellules de mammifère se sont imposées en tant que plateforme privilégiée pour la

production de protéines complexes et glycosylées (Rasmussen et al., 2012). En effet, bien que les autres plateformes, en particulier les bactéries et autres cellules procaryotes présentent de très hauts rendements à faible coût, les cellules de mammifères ont l'avantage de produire des protéines glycosylées similaires à celles retrouvées chez l'humain (Baldi et al., 2005), contrairement à d'autres types de cellules.

En effet les modifications post-traductionnelles que les cellules de mammifères peuvent appliquer est le principal facteur poussant à leur utilisation. En particulier, la glycolysation est considérée comme l'étape la plus importante pour produire des anticorps à but thérapeutique (Jefferis, 2005). Le but des anticorps est de se fixer à divers antigènes spécifiques grâce à la spécificité de leur région dite Fab (*antigen-binding fragments*). Mais leur base, dite Fc (fragment crystallizable region), permet de se lier à d'autres protéines portée par exemple des cellules immunitaires, ce qui permet l'élimination des cellules visées par l'anticorps. Une mauvaise ou une absence de glycolysation de l'anticorps peut créer des problèmes de forme, de solubilité, ou ces derniers peuvent être rejetés par l'organisme. La glycosylation permet donc la création de traitements efficaces et surtout acceptés par le corps humain. Ainsi aujourd'hui plus de 60% des protéines recombinantes sont produites par des cellules de mammifère (Wurm, 2004), dont les cellules de bébé hamster (BHK), des cellules humaines de foie, mais surtout les CHO.

2.1.2 Les cellules CHO

Depuis les premières cultures en 1958 par Theodore T. Puck (Tjio & Puck, 1958), les cellules CHO sont la plateforme privilégiée pour la production des protéines recombinantes et en particuliers des anticorps monoclonaux (Ferrer-Mirailles N. et al. 2009). Leur simple génome en font un organisme plus facile à étudier, et leurs qualités de production en font un candidat idéal pour études. C'est aujourd'hui l'un des systèmes cellulaires les mieux connus, présentant de très nombreux avantages pour la production d'anticorps. Les cellules CHO ont une croissance très stable et donc facile à contrôler et une très bonne viabilité (Chu & Robinson, 2001). Mais surtout, les cellules CHO effectuent des modifications post-traductionnelles plus facilement acceptées par le corps humain comparé à d'autres cellules (Ghaderi et al., 2012, Jayapal, et al., 2007). Les cellules CHO regroupent de nombreuses lignées cellulaires créées par insertion d'ADN recombinant. Ces cellules présentent un faible nombre de chromosomes et ont prouvé être très efficaces pour la création de nouveaux clones exprimant un gène d'intérêt (Fisher et al, 2015).

2.2 Le métabolisme des cellules CHO

Nous présentons ici les voies centrales du métabolisme des cellules CHO, des substrats principaux au produit d'intérêt et à la croissance (i.e. division) cellulaire.

Comprendre l'organisation du métabolisme cellulaire, se déclinant en un réseau intégré de réactions biochimiques, est une étape très importante pour évaluer des options d'amélioration de la production d'anticorps monoclonaux. Bien que la plupart des cellules vivantes présentent des organisations internes très similaires, chaque organisme aura ses propres spécificités qu'il convient d'étudier pour en décrire adéquatement le fonctionnement, i.e. les liens entre les entrées (i.e. substrats) et les sorties (i.e. produits et croissance). Une bonne compréhension du métabolisme permettra, dans un premier temps, de définir des critères adéquats de sélection de lignées cellulaires productrices, et dans un deuxième temps, de définir et de maintenir des conditions maximisant la productivité de protéines de qualité.

Bien que le nombre de réactions se produisant dans une cellule soit très grand, au-delà du millier, l'étude du métabolisme se concentre principalement sur le métabolisme central du carbone, qui permet à la cellule de fonctionner en alimentant l'ensemble des voies cataboliques et anaboliques, et ainsi de se diviser et de produire des protéines complexes. La figure 2-1 présente une carte simplifiée du métabolisme du carbone. On peut diviser ce dernier en sous-sections principales : A : la glycolyse ; B : le cycle de Krebs ; C : la voie des pentoses phosphates.

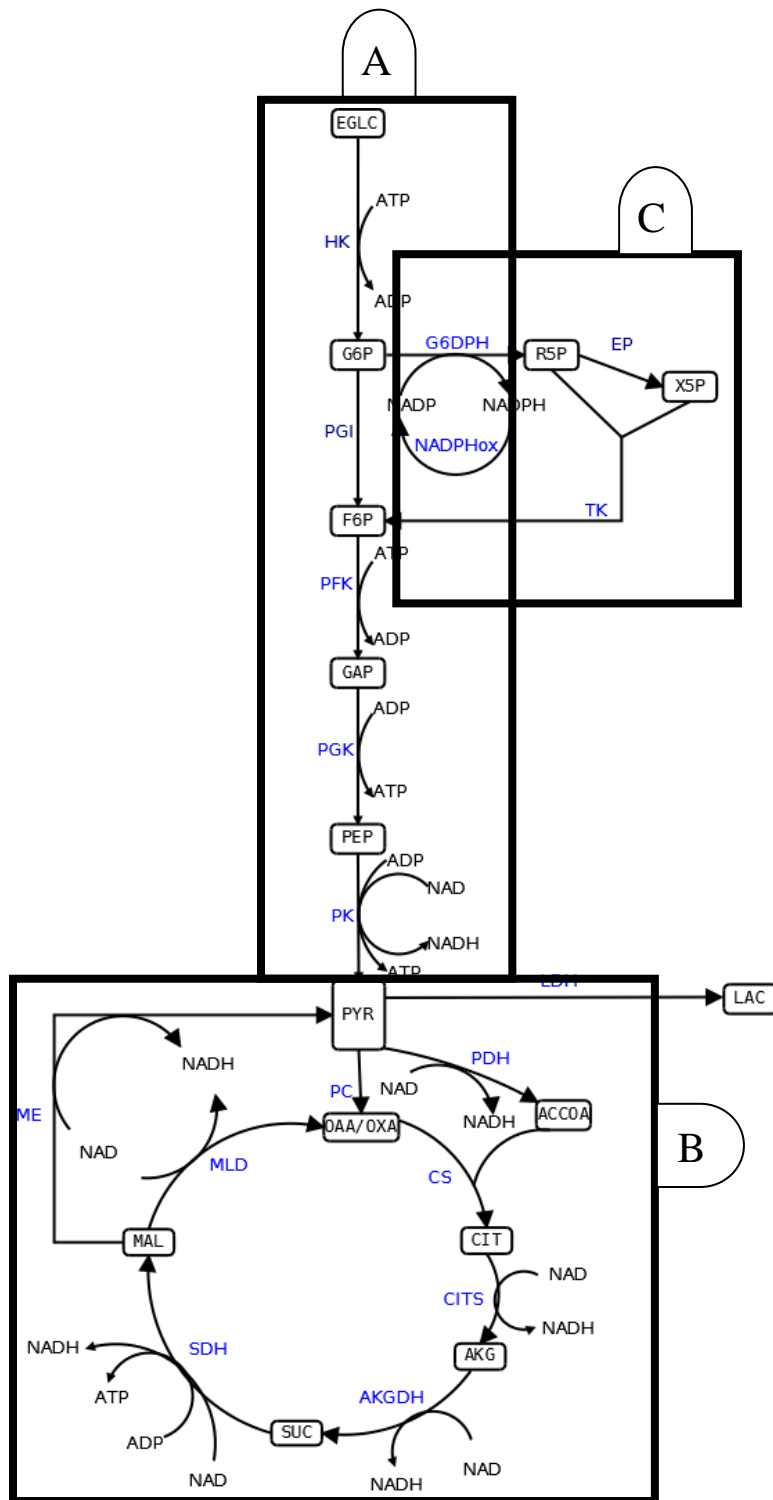


Figure 2-1 : Métabolisme central du carbone

A : La glycolyse

La glycolyse est une suite de réactions qui transforme progressivement le glucose en pyruvate. Cette voie est à la base du bon fonctionnement d'une cellule eucaryote. En effet, la transformation du glucose et de ses intermédiaires génère de l'énergie par la formation de deux molécules d'ATP

et de NADH, par molécule de glucose. Cette voie alimente celle des pentoses phosphates et le cycle de Krebs. Étant le principal point d'entrée de substrats carbonés de la cellule, la glycolyse exerce une grande influence sur le reste du métabolisme ; par exemple des modifications génétiques de certaines de ses enzymes peuvent mener à la mort cellulaire due au stress oxydatif induit (Jeong D.-W. et al. 2004). Dans une perspective tant économique que de productive des bioprocédés, une connaissance adéquate de la glycolyse permettra d'optimiser l'utilisation du glucose par la cellule pour l'objectif recherché, soit la croissance et/ou la productivité en protéine d'intérêt.

B : Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs, ou cycle des acides tricarboxyliques, est un cycle de réactions qui transforme le pyruvate produit par la glycolyse en différents intermédiaires, métaboliques, énergétiques et oxydo-réductifs. Dans sa globalité, ce cycle produit plus d'énergie que la glycolyse, les intermédiaires oxydo-réductifs NADH, FADH et FADH₂ alimentant la chaîne respiratoire qui produit ainsi massivement de l'énergie (ATP), et des précurseurs pour d'autres réactions du métabolisme, en particulier pour les métabolismes des acides aminés ainsi que des lipides et acides gras, etc. L'emploi de conditions de culture en bioréacteur favorisant un cycle de Krebs actif (i.e. flux réactifs élevés) favorisera une chaîne respiratoire active, avec une production élevée en énergie (i.e. ATP) ainsi que des taux de production élevés en intermédiaires métaboliques alimentant des voies de synthèses essentielles telles que pour les protéines, les lipides et acides gras, etc. (Sheikholeslami Z. et al 2013, Antoiwicz M.R. 2006) Cette voie est donc essentielle au maintien de la viabilité cellulaire.

C : La voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates concerne l'utilisation du glucose-6-phosphate, premier intermédiaire dans la glycolyse, comme précurseur de différentes réactions menant à l'oxydation de NADP⁺ en NADPH, vecteur d'énergie pour d'autres réactions métaboliques, ainsi qu'à la production de nucléotides requis pour la synthèse de macromolécules essentielles à la croissance cellulaire telles que l'ADN et l'ARN. Cette voie est donc primordiale à la croissance cellulaire.

2.3 Modélisation du métabolisme

Dans le but d'améliorer la productivité et la viabilité des cellules CHO en bioréacteur, l'industrie emploie, entre autres, des méthodes de transcription d'ADN recombinant. L'ADN des cellules est spécifiquement modifié pour apporter de nouvelles propriétés ou améliorer celles déjà existantes (Brown A.J. et al, 2015). Ces modifications visent essentiellement à modifier des enzymes spécifiques, en les sur/sous-exprimant en modifiant leur promoteur, ou à en modifier les caractéristique en introduisant un nouveau gène. Pour appliquer ces processus, il est donc important, dans un premier temps, de connaître le génome des cellules étudiées, et dans un deuxième temps d'identifier les parties de ce génome correspondant à chaque enzymes susceptibles d'améliorer la production de protéines recombinantes ou tout autres traits. La présente section se concentre donc sur l'analyse du métabolisme cellulaire, connaissance permettant d'identifier les facteurs les plus prometteurs pour effectuer une modification de l'expression génétique des cellules CHO.

2.3.1 Méthodes reposant sur le régime pseudo-stationnaire

2.3.1.1 Analyse des flux métaboliques (« Metabolic Flux Analysis » ou MFA)

La MFA est une méthode ayant pour but d'estimer les flux de production et de consommation des métabolites à l'intérieur d'une cellule, en utilisant principalement des données expérimentales de la composition de l'environnement extracellulaire. Le principe est de représenter mathématiquement la cellule comme une suite de réactions définies par une vitesse (i.e. flux) ainsi que la stœchiométrie des réactions. L'ensemble des réactions peut alors être représenté par le produit de la matrice S des coefficients stœchiométriques et du vecteur contenant les flux associés aux concentrations en métabolites. On obtient ainsi un système d'équations linéaires qui peut être représenté par la matrice S dite matrice stœchiométrique, où chaque ligne contient les coefficients stœchiométriques pour un métabolite, et chaque colonne représente donc une réaction. Un bilan de matière donne :

$$\frac{dX}{dt} = S.v - \mu.X$$

où X est le vecteur des métabolites, v est le vecteur des flux de réactions, μ est le taux de croissance spécifique des cellules. $-\mu X$ représente le facteur de dilution dû à la division cellulaire. La méthode MFA suppose alors deux hypothèses (Quek L.E. et al 2010) :

- Le terme dilution est faible et peut être négligé, et donc $\mu X \approx 0$
- Le système est dans un état pseudo-stationnaire, et donc $\frac{dX}{dt} = 0$

Finalement, l'approche MFA repose sur la résolution du système d'équation :

$$S.v = 0$$

Cette méthode a été très utilisée sur différents types de cellules tels que *E. coli* (Fu Y. et al), des cellules de plante (Dersch L.M. et al. 2016) et cellules CHO (Zamorano F. et al, 2010., Ahn W.S. et al., 2011). Des études MFA ont été très importantes pour la compréhension du réseau métabolique et donc de l'ingénierie métabolique (Boghigian B.A. et al., 2010). Malgré tout, cette méthode présente des problèmes quant à la possibilité de prédiction de flux dans certains cas si les réactions sont réversibles, ou si il y a la présence de voies parallèles ou de cycles (Rios-Esteba R. et Lange B.M., 2007). Il y a donc un fort besoin de mesurer directement les flux internes à la cellule pour rajouter des contraintes. La méthode la plus utilisée dans ce cas est le marquage à l'isotope ^{13}C (Wiechert W., 2001, Gopalakrishnan S. et al, 2015, Zhao et al., 2015), notamment pour les cellules CHO (Goudar C. et al., 2010, Nicolae A. et al., 2014). Ce genre de méthodes permet de régler certains problèmes au niveau de la détermination des flux. Mais une limite majeure de la MFA concerne le manque de description des dynamiques cellulaires dû à l'hypothèse d'état quasi-stationnaire des cellules (Rios-Esteba R. et Lange B.M., 2007, Varner J. et Ramkrishna D, 1999).

2.3.1.2 Analyse de flux métaboliques balancés (« Flux balance analysis » ou FBA)

La méthode des flux métaboliques est une variante de la MFA dont le but est toujours de déterminer les flux de métabolites dans un réseau métabolique. De ces flux il devient possible entre autres de prédire le taux de croissance des métabolites, ou l'influence de modifications génétiques. Comme pour la MFA, le calcul repose sur la construction d'une matrice stœchiométrique contenant les coefficients stœchiométriques de chaque réaction et métabolite. La différence avec la MFA est l'introduction d'une fonction objectif qui est définie telle que chaque

réaction est considérée avec une importance différente. Cela a pour but de sélectionner un phénotype particulier pour réduire le champ des solutions possibles. En effet la FBA est utilisée lorsque le modèle considéré contient plus d'équations que de variables, i.e. plus de réaction que de métabolites ou système sous-déterminé. Dans un tel cas il existe plusieurs solutions au problème de résolution dans un état de régime pseudo-stationnaire ($S.v = 0$). L'introduction de contraintes supplémentaires représentées par la fonction objectif permet de limiter les solutions à seulement ce que l'on cherche à minimiser, stabiliser ou maximiser. Ces contraintes peuvent être d'origines régulatrices, thermodynamiques, ou basées sur la maximisation de la production (Kauffman K.J. et al 2003). Il est également possible d'utiliser une méthode dite de la pseudo-inverse pour résoudre un problème sous-déterminé avec la méthode MFA. Toutefois, la précision d'estimé en est largement réduite.

2.3.1.3 Analyse des voies métaboliques (« Metabolic Pathway Analysis » ou MPA)

L'analyse des voies métabolique se base sur le même principe que la MFA et la FBA, à la différence que l'objectif n'est pas de trouver une solution unique au problème $S.v = 0$, mais d'identifier l'ensemble des vecteurs de flux v qui vérifient l'équation, sans autre contrainte que thermodynamique (Trinh C.T. et al, 2009). Les systèmes étudiés étant généralement sous-déterminés, le nombre de solutions est infini et il s'agit alors de trouver un ensemble de solutions optimales.

2.3.1.4 Analyse du contrôle métabolique (« Metabolic control analysis » ou MCA)

L'analyse du contrôle métabolique s'intéresse à l'influence du niveau d'activité d'enzymes précises sur les flux et/ou les concentrations des métabolites intermédiaires. Le but est donc de repérer les enzymes les plus influentes du réseau métabolique considéré. Ainsi à chaque enzyme sont associés deux coefficients de contrôle définis par (Fell, 1997) :

$$C_E^J = \frac{\partial J}{\partial E} \cdot \frac{E}{J} = \frac{\partial \ln(J)}{\partial \ln(E)}$$

$$C_E^Y = \frac{\partial Y}{\partial E} \cdot \frac{E}{Y} = \frac{\partial \ln(Y)}{\partial \ln(E)}$$

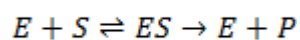
où E est la concentration d'une enzyme, J est un flux de réaction, et Y la concentration d'un métabolite intermédiaire. Ces deux coefficients mesurent la variation du flux ou de la concentration du métabolite quand on modifie la concentration de l'enzyme E . La méthode suppose alors que le système est en état de régime pseudo-stationnaire, et dans ce cas, pour un flux J donné, la somme des coefficients de contrôle associés pour toutes les enzymes doit être égale à 1 alors que pour un métabolite intermédiaire Y , la somme des coefficients de contrôle associés pour toutes les enzymes doit être égale à 0.

2.3.2 Méthodes dynamiques

Alors que les méthodes précédentes reposent sur l'étude de cellules en état pseudo-stationnaire, il est également possible d'étudier l'ensemble d'un réseau métabolique sous l'angle des dynamiques en jeu, également par la description des vitesses de réaction ou flux et des coefficients stœchiométriques réactionnels. On parlera alors de modélisation dynamique. Une approche dynamique sera alors complémentaire aux autres approches mentionnées précédemment en permettant d'estimer dans le temps l'évolution, non seulement des flux des réactions mais également des concentrations en métabolites extracellulaires et surtout intracellulaires.

2.3.2.1 Description des cinétiques des vitesses réactionnelles

Dans une cellule, le réseau métabolique est une suite de réactions enzymatiques. Les enzymes s'associent aux substrats puis permettent une réaction efficace régénérant l'enzyme et donnant le produit. Ce sont donc les enzymes, en plus des substrats, qui vont définir la vitesse de réaction. La modélisation utilisée dans ce cas est, entre autres, celle de Michaelis-Menten, qui à partir d'une réaction enzymatique :



définie la vitesse de réaction initiale :

$$V = V_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

où E est l'enzyme, S le substrat et P le produit, ES est le complexe intermédiaire enzyme-substrat. V_{\max} est la vitesse maximale de la réaction, et K_m est la constante de Michaelis et est relié directement à l'affinité de l'enzyme pour le substrat S, où plus K_m est petit, plus l'affinité est grande. V_{\max} et K_m sont définies par les constantes des réactions liées à la liaison et la dissociation enzyme-substrat :

$$K_m = \frac{k_r + k_{cat}}{k_f}$$

$$V_{\max} = k_{cat}E_0$$

où k_r , k_f et k_{cat} sont les taux respectifs de la liaison enzyme-substrat, de l'inverse de cette même réaction, et de la dissociation enzyme-produit. E_0 est la concentration initiale en enzyme (concentration en enzyme non liée). Ce modèle suppose que la concentration en complexe enzyme-substrat est constante et est atteinte rapidement, c'est-à-dire que la réaction de liaison et son inverse ont des taux de réaction plus importants que la réaction de dissociation entre l'enzyme et le produit.

Si la réaction comprend plusieurs substrats ou co-facteurs, comme c'est le cas pour la plupart des réactions intracellulaires, plusieurs représentations ont été proposées dont la suivante :

$$V = V_{\max} \prod_{i=1}^N \frac{[S_i]}{K_{m,i} + [S_i]}$$

où l'on considère chaque facteur intervenant comme ayant une cinétique michaelienne. Il est également possible de développer spécifiquement en se calquant sur les mécanismes s'opérant, tel que fait par Michaelis-Menten.

2.3.2.2 Régulation

En plus des co-facteurs, essentiels à certaines réactions biochimiques, tels que l'ATP, l'ADP, etc., certains intermédiaires auront un rôle de régulation sur ces réactions biochimiques précises. On peut citer par exemple l'hexokinase, l'enzyme qui agit lors de la première réaction de glycolyse, qui est inhibée par son produit le glucose-6-phosphate (Berg et al, 2002) ; ou la pyruvate kinase qui est activée par le fructose-6-phosphate (Mulukutla et al, 2010). Les

régulations sont plus complexes à modéliser, mais sont très importantes à considérer dans les modèles. En effet, on peut voir que dans d'autres modélisations plus classiques que sont la MFA, FBA ou MCA, leur caractère de modélisation quasi-statique les limite en terme de prédiction de changements métaboliques ; les systèmes de régulation leur sont aussi plus difficiles à modéliser dû à leur représentation linéaire.

Mais un modèle purement dynamique permet facilement d'étudier différentes approches de modélisation de régulation. L'ajout et l'étude d'une combinaison de systèmes de régulation dans notre modèle cinétique a permis de prédire le changement de phase de cellules CHO d'un métabolisme oxydatif à un métabolisme anaérobique (Ghorbaniaghdam et al, 2014).

2.3.2.3 Les modèles dynamiques développés

Après une large domination des méthodes de modélisation quasi-statique pour la compréhension du métabolisme cellulaire, la tendance est maintenant de chercher à modéliser dynamiquement le comportement des cellules. Une modélisation dynamique permet de modéliser n'importe quelle phase d'une cellule, différents milieux et modes de culture, et d'anticiper des modifications génétiques mais surtout permet de simuler des comportement ne rentrant pas en condition quasi-statique. Plusieurs modèles ont déjà été développés dans ce but. Notamment par Nolan et Lee (Nolan et Lee, 2011), qui ont développé un modèle métabolique des CHO basé sur l'évolution temporelle des métabolites internes et sur la cinétique de Michaelis-Menten. Le modèle comporte des paramètres pour simuler des changements métaboliques dus à la température et à la présence en oxygène. De plus, des mécanismes de régulation ont pu être rajoutés par la suite (Nolan et Lee, 2012). Mais les calculs sont effectués à partir de la connaissance des métabolites extracellulaire et le calcul des flux est fait grâce à une MFA et suppose donc des flux en régime quasi-statique, ce qui limite les prédictions sur le court terme du comportement cellulaire, en particulier de l'évolution des métabolites internes.

Des modèles purement métabolique ont été développé pour d'autres systèmes biologiques : E.coli (Chassagnole et al., 2002) et cellules de plantes (Cloutier et al., 2007). Pour les CHO, notre équipe a développé un modèle dynamique (Ghorbaniaghdam, et al., 2013) sur une lignée de CHO activée au butyrate de sodium, qui a ensuite été utilisé pour montrer les différences métaboliques entre différents clones d'une même lignée (Ghorbaniaghdam, Chen et al., 2014), et enfin des

métabolismes de régulations de la glycolyse ont permis de décrire le comportement en manque d'oxygène (Ghorbaniaghdam, Henry et al., 2014). Ce même modèle a été adapté pour pouvoir modéliser deux modes de culture, cuvée et cuvée alimentée, et deux milieux différents (Robitaille et al 2015).

Mais ce genre de modèle comprend un très grand nombre de paramètres à identifier. Ces paramètres sont normalement inter-dépendants et leur valeurs déterminées seront tributaires de la diversité et de la qualité des données expérimentales disponibles. Ce type de modèle ne peut effectivement être validé sans données expérimentales fiables et couvrant l'ensemble des sous-réseaux métaboliques, incluant les nutriments essentiels. Aussi, comme les jeux de données normalement collectées sont généralement restreints à des mesures extracellulaires, il y a un fort besoin en nouvelles données, surtout intracellulaires, pour être en mesure d'affiner tout modèle dynamique. Et cette contrainte concerne également le type de modèle développé dans notre laboratoire, où les données intracellulaires à des niveaux de concentrations aux limites des constantes d'affinité sont très difficiles à obtenir tout en maintenant une viabilité cellulaire adéquate permettant l'analyse des résultats. Or, l'obtention de données intracellulaires est coûteuse en argent et en temps, surtout si l'on cherche à étudier des conditions risquées pour la viabilité cellulaire. Cette maîtrise a ainsi pour but de montrer qu'il est possible d'obtenir de nouvelles données de ce type de manière efficace en exploitant un modèle dynamique. À ce titre, le modèle développé dans notre laboratoire a servi de base à une étude de cas portant sur le métabolisme d'un composé essentiel à la respiration de cellules CHO, soit l'oxygène.

CHAPITRE 3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Culture cellulaire

La lignée cellulaire utilisée lors des expériences est la lignée CHO-HP produisant les anticorps monoclonaux anti-CD20. Elles ont été cultivées dans un milieu HyClone SFM4CHO (GE Healthcare, USA) en complément avec 4 mM de glutamine (Sigma-Aldrich, USA). Les cellules étaient conservées dans 6 mL de milieu à une concentration de $2,0 \cdot 10^6$ cellules/mL dans un flacon d'agitation de 125 mL à 35°C sous 5% de CO₂. Les cellules étaient observées grâce à un hémocytomètre sous un microscope optique, et en utilisant la méthode d'exclusion au bleu de trypan pour calculer la densité et la viabilité cellulaire.

3.2 Tests de respiration

Un respiromètre précédemment développé par notre équipe (Lamboursain et al., 2002) a été utilisé lors d'expériences de détermination de l'affinité des cellules à l'oxygène et leur viabilité en milieu hypoxique. Brièvement, le système se constitue d'un tube en verre fait d'une seringue de 10-ml, dans lequel est placé 5 mL de milieu avec une concentration précise en cellules. Le tube est fermé par une sonde à pression partielle d'oxygène et un joint torique en caoutchouc, rendant le tout imperméable à l'air. Le milieu est préalablement exposé à un mélange précis de N₂ et de O₂ pendant 10 minutes, dans le but d'imposer une concentration initiale d'oxygène dissous dans le milieu. Ce dernier était ensuite transféré dans le tube, accompagné d'un agitateur magnétique en forme de croix, la sonde et le joint sont ensuite placés. Le gaz restant était expulsé de la chambre du respiromètre par la valve Luer-lock installé à la sortie du corps de la seringue. Le respiromètre était ensuite rapidement placé dans un Erlenmeyer rempli avec de l'eau à 37°C chauffé par une plaque magnétique chauffante. La sonde pO₂ a été calibrée avec du milieu frais, sans cellule, bullé avec de l'azote pur pour la valeur à 0%, ou de l'oxygène pur pour celle à 100%.

Comme détaillé dans Lamboursain et al. (2002), les valeurs de la sonde doivent être corrigées, à cause d'un décalage temporelle dans les mesures, en utilisant la formule suivante :

$$DO_{corr}(t) = DO_{raw}(t) + \tau_r * d(DO_{raw}(t))/dt$$

Où DO_{raw} est la concentration d'oxygène dissous mesuré. Le taux de consommation d'oxygène (OUR) peut alors ensuite être calculé grâce à la formule (Lamboursain et al., 2002) :

$$\text{OUR} = dDO/dt - (0.515 * DO - 0.087)$$

3.3 Modélisation mathématique

L'un des principaux aspect de cette étude est l'utilisation d'un modèle mathématique décrivant le comportement cellulaire (Ghorbaniaghdam et al., 2013). Ce modèle se base sur la description du métabolisme présenté à la figure ..., incluant la glycolyse, le cycle de Krebs, la voie des penthose-phosphates (PPP) et les voies énergétiques de la cellule. Le métabolisme des acides aminés, la croissance cellulaire et l'évolution de la concentration des anticorps monoclonaux dans le milieu sont aussi décrits. Chacune de ces réactions est sujette à une cinétique multiplicative de Michaelis-Menten. Elles dépendent des substrats et des cofacteurs impliqués dans les réactions métaboliques.

Le model contient 53 variables indépendantes, représentant les métabolites intracellulaires et extracellulaires, et 39 réactions. Il contient aussi 148 paramètres, représentés par V_{max} (vitesse de réaction maximale) et K_m (constante d'affinité d'une enzyme pour chaque substrat). Le modèle tient aussi compte des flux de régulation majeurs intervenant dans la glycolyse.

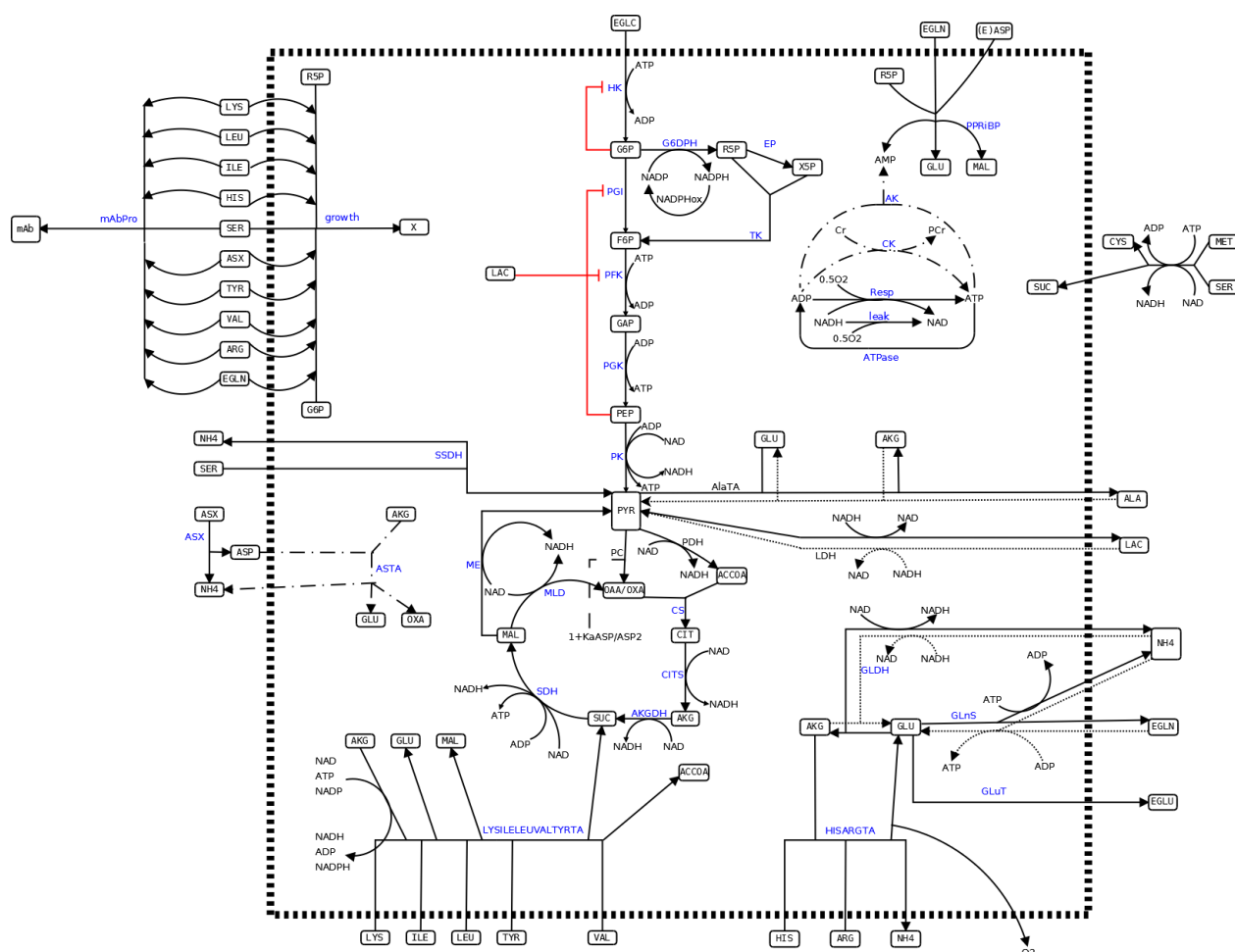


Figure 3-1 : Réseau métabolique simulé par le modèle. La ligne en pointillé délimite la membrane de la cellule et ainsi sépare les métabolites et réactions internes de ceux et celles prenant place à l'extérieur de la cellule. Chaque petit carré représente un métabolite intermédiaire et donc une variable du modèle. Les flèches au trait plein représentent une réaction vers la création des produit, les flèches au trait pointillé représente la réaction inverse. Les lignes rouges représentent les mécanismes de régulations considérés dans le modèle.

3.4 Analyse de sensibilité

À cause du très grand nombres de paramètres présent dans le modèle, il n'y pas possible de tous les obtenir précisément à partir des données expérimentales. La plupart d'entre eux seront fixés à des valeurs jugées appropriées ou trouvées dans la littérature, tandis que certains seront déterminés en utilisant les données expérimentales.

Pour identifier les paramètres clés, tous les paramètres du modèle ont été soumis à une analyse de sensibilité ayant pour but d'identifier ceux ayant le plus d'influence. Les paramètres ont été classés en utilisant la méthode *Morris Screening* (Morris, 1991), avec une fonction de coût pondérée définie de la façon suivante :

$$FonctionDeCoût(\Delta) = \frac{1}{\Delta n_{var} n_{time}} \sum_{m=1}^{n_{var}} \sum_{t=1}^{n_{time}} \frac{(x_{m,t}^{\Delta} - x_{m,t}^{norm})^2}{(\sum_{t=1}^{n_{time}} x_{m,t}^{norm})^2}$$

Où n_{var} est le nombre de variables mesurées (53 dans notre cas) ; n_{time} est le nombre de points d'échantillonnage pour chaque variable (144 dans notre cas) ; $x_{m,t}^{\Delta}$ est la valeur de la $m^{ème}$ variable, au temps t , lorsque la valeur nominale d'un paramètre a été modifiée et $x_{m,t}^{\Delta}$ sa valeur avec la valeur nominale du paramètre. Cette fonction calcule la différence quadratique pondérée entre une simulation normale, et une autre où un paramètre a été modifié par un facteur Δ , en pourcent, par rapport à sa valeur nominale.

3.5 Estimation des paramètres et intervalles de confiance

Une fois les paramètres d'intérêts, les plus sensibles, ont été choisis, l'objectif fut de s'assurer que ces derniers soient identifiés en utilisant un algorithme de régression. Pour se faire, une optimisation des moindres carrés utilisant une fonction de coût pondérée a été implémentée :

$$LeastSquareFunction(X) = \frac{1}{n_{var} n_{time}} \sum_{m=1}^{n_{var}} \sum_{t=1}^{n_{time}} \frac{(x_{m,t}^{sim} - x_{m,t}^{exp})^2}{(\sum_{t=1}^{n_{time}} x_{m,t}^{exp})^2}$$

Où x représente un paramètre mesuré, x_{sim} est sa valeur simulée et x_{exp} est sa valeur expérimentale. Le but est de minimiser la valeur de cette fonction.

Les données expérimentales utilisées furent les mêmes que celles ayant permis de déterminer toutes les valeurs du modèle (Ghorbaniaghdam, Chen, et al., 2014). La fonction précédente a été minimisée en utilisant l'algorithme *fminunc* de MATLAB. Cette fonction peut calculer la matrice Hessienne du groupe de paramètres considérés, et a été utilisée pour calculer les intervalles de confiance pour chacun de ces paramètres.

Pour les cas où il n'était pas possible d'obtenir directement la matrice Hessienne, les formules des différences finies furent utilisées pour la calculer :

$$H_X(i,i) = \frac{-f(X + 2k * e_i) + 16f(X + k * e_i) - 30f(X) + 16f(X - k * e_i) - f(X - 2k * e_i)}{12k^2}$$

$$H_X(i,j)_{i \neq j} = \frac{f(X + k(e_i + e_j)) - f(X + k(e_i - e_j)) - f(X + k(e_j - e_i)) + f(X - k(e_i + e_j))}{4k^2}$$

Où X est le vecteur des paramètres sélectionnés ; $H_X(i,j)$ est la valeur de la matrice Hessienne à la position (i,j) pour un X donné ; f est la somme des moindres carrés ; k est ici fixé à la valeur $1e^{-3}$; e_i et e_j sont les vecteurs unités de même dimensions que X, remplis par des 0 hormis à la position i ou j. Les intervalles de confiance pour les paramètres sélectionnés sont alors déterminés par la matrice de covariance du vecteur X. Dans notre cas, cette matrice de covariance est égale à la matrice Hessienne H multipliée par l'erreur sur les variables mesurées. Cette erreur possède deux composantes : (i) l'erreur expérimentale intrinsèque aux mesures, Err_{exp} et (ii) l'erreur de régression, la différence entre le modèle et les mesures, Err_{sim} . L'erreur pour chaque paramètre peut alors être calculée en prenant la racine carré de la valeur diagonale de H correspondante. Ainsi, l'erreur d'un paramètre X_i est définie telle que :

$$Err(X_i) = \sqrt{(H^{-1})_{i,i}} * \sqrt{Err_{exp}^2 + Err_{sim}^2}$$

La valeur $Err(X_i)$ est centrée autour de la valeur de X_i , est l'intervalle de confiance associé est alors :

$$[X_i - Err(X_i) ; X_i + Err(X_i)]$$

3.6 Planification expérimentale

Le but de la planification expérimentale est de trouver la meilleure expérience qui peut permettre de réduire les intervalles de confiance. En d'autres mots, en optimisant l'expérimentation, il est possible de réduire le nombre d'expériences nécessaires pour obtenir une précision voulue, et

ainsi du temps et de l'argent sont économisés. La méthode consiste à calculer une série de modélisations avec différentes valeurs de paramètres d'entrées contrôlables, et de choisir les meilleurs résultats.

Différents critères peuvent être utilisés pour la planification expérimentale (Wong, W.K., 1994). Dans le cas présent, une optimisation optimale de type D a été choisie, car cette méthode fonctionne bien lorsque le modèle est non linéaire et hautement complexe comme cela est le cas ici. La fonction considérée est définie par $\det(H)$, soit le déterminant de la matrice Hessienne H définie à la section précédente. L'objectif est de maximiser cette valeur en fonction des valeurs des variables qui peuvent être modifiées pendant le cours d'une expérience de culture cellulaire. L'augmentation du déterminant de H , entraîne la diminution de son inverse, H^{-1} . De ce fait les valeurs diagonales de H^{-1} diminuent de manière globale et ainsi les intervalles de confiance des paramètres choisis diminuent de même de manière globale, ce qui signifie que pour chaque paramètre, il est attendu que leur intervalle de confiance va diminuer, bien qu'il puisse augmenter pour certains d'entre eux.

CHAPITRE 4 RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1 Sélection des paramètres d'intérêt - application d'une analyse de sensibilité

La présence de plus d'une centaine de paramètres cinétique dans le modèle ne permet pas l'identification de la totalité d'entre eux à partir des données expérimentales disponibles : le système est fortement sous-déterminé. De ce fait, dans un premier temps, notre attention fut dirigée sur un nombre réduit de paramètres sur lesquels travailler, car comme l'a montré une précédente étude (Ghorbaniaghdam A. et al., 2014), les paramètres V_{\max} sont plus sensibles que les constantes d'affinité K_m . De plus, il est très difficile d'imposer des conditions de culture permettant de couvrir un large spectre de concentration intracellulaire de métabolites intermédiaires sans affecter la viabilité cellulaire, et donc la fiabilité des données expérimentales. L'objectif devient alors de sélectionner une partie des ses paramètres dans le but de réduire l'erreur d'identification. Ce jeu de paramètres a été choisit en utilisant la fonction objectif définie à la section 3.4. Pour chaque paramètres V_{\max} , différentes simulations ont été lancées avec pour chacune une valeur différente pour le paramètre considéré, et elles ont été comparées à la simulation nominale, où la valeur du paramètre est alors celle obtenue par Gorbaniagdam. (Gorbaniagdam A. et al, 2014).

A partir des résultats présentés dans le tableau 4-1, nous avons limités le nombre de paramètres à cinq des plus sensibles : V_{\max_HK} , V_{\max_ATPase} , $V_{\max_NADPHox}$, V_{\max_growth} , V_{\max_LDH} . Ce jeu de paramètres est en accord avec d'autres études (Badsha Md. B. et al., 2016, Tsao Y.-S. et al., 2005), où les paramètres associés à la régulation du glucose (cf V_{\max_HK}) et du lactate (cf V_{\max_LDH}) ont présenté une influence maximale sur le comportement des cellules CHO. V_{\max_growth} est logiquement un autre paramètre sensible, dû fait de la grande influence de la concentration cellulaire sur la production et la consommation des métabolites. La voie énergétique représentée par $V_{\max_NADPHox}$ et V_{\max_ATPase} sont aussi des paramètres logiquement sensibles, considérant le fait que le métabolisme cellulaire est entraîné par ses mécanismes énergétiques. Il faut cependant noter que les voies énergétiques de la cellule est simplifié dans le modèle et regroupe une série de différentes réactions.

Les cinq paramètres sélectionnés parmi les plus sensibles couvrent une majeure partie du métabolisme cellulaire. V_{max_HK} , représente la phosphorylation du glucose par l'enzyme hexokynase, V_{max_ATPase} décrit la consommation d'énergie par la décomposition de l'ATP en ADP par les ATPases, $V_{max_NADPHox}$ de la voie des pentoses phosphates représente les réactions d'oxydation de NADPH en NADP, V_{max_growth} représente la croissance cellulaire (par division), et V_{maxf_LDH} représente la production du lactate à partir du pyruvate. De cette manière, les paramètres sont moins corrélés les uns aux autres.

Quand bien même V_{max_EP} se présente comme le paramètre le plus influent, il n'a pas été pris en considération car les valeurs associées de la fonction objectif déviait de manière trop importante avec la variation de la valeur du paramètre. V_{maxf_PGI} a été écarté car la réaction associée est très corrélée à celle correspondante à V_{max_HK} (voir figure 3-1). A la place, une réaction d'une autre partie du métabolisme fut choisie : V_{maxf_LDH} , pour s'assurer que la production de lactate soit considérée.

Tableau 4-1 : Valeurs de la fonction objectif pour les 12 paramètres les plus influant. La première valeur est la sensibilité lorsque le paramètre voit sa valeur diminuée, et la seconde lorsque qu'elle est augmentée. La troisième valeur est la moyenne des deux premières, et sert de valeur de référence pour classer les paramètres.

Paramètres	Valeur du paramètre diminuée	Valeur du paramètre augmentée	Moyenne
Vmax_EP	27,19	7,40	17,30
Vmax_ATPase	10,59	13,72	12,15
Vmax_HK	13,85	6,95	10,40
Vmax_NADPHox	8,38	7,27	7,82
Vmax_growth	9,20	6,00	7,60
Vmaxf_PGI	7,27	7,14	7,20
Vmax_AKGDH	8,00	5,34	6,67
Vmax_PDH	7,25	5,95	6,60
Vmaxf_LDH	6,98	5,04	6,01
Vmax_HISARGTA	6,35	4,83	5,59
Vmax_G6DPH	6,28	4,74	5,51
Vmax_GlnT	4,99	3,87	4,43

4.2 Identification des paramètres et intervalles de confiance

Avec les cinq paramètres sensibles sélectionnés, une régression des moindres carrés pondérée a été utilisée pour identifier les paramètres. Il en résulta une bonne simulation comparée aux données expérimentales (figure 4-1) utilisées dans ce travail et extraite de Ghorbaniaghdam A. et al. (2013). Les intervalles de confiance ont été calculé selon la méthode présentée à la section 3.5, en utilisant la matrice Hessienne. Les valeurs des paramètres et les erreurs correspondantes sont présentées dans le tableau 4-2. Les erreurs sont relativement petites à cause du fait que les paramètres sélectionnés ont une grande influence sur le modèle.

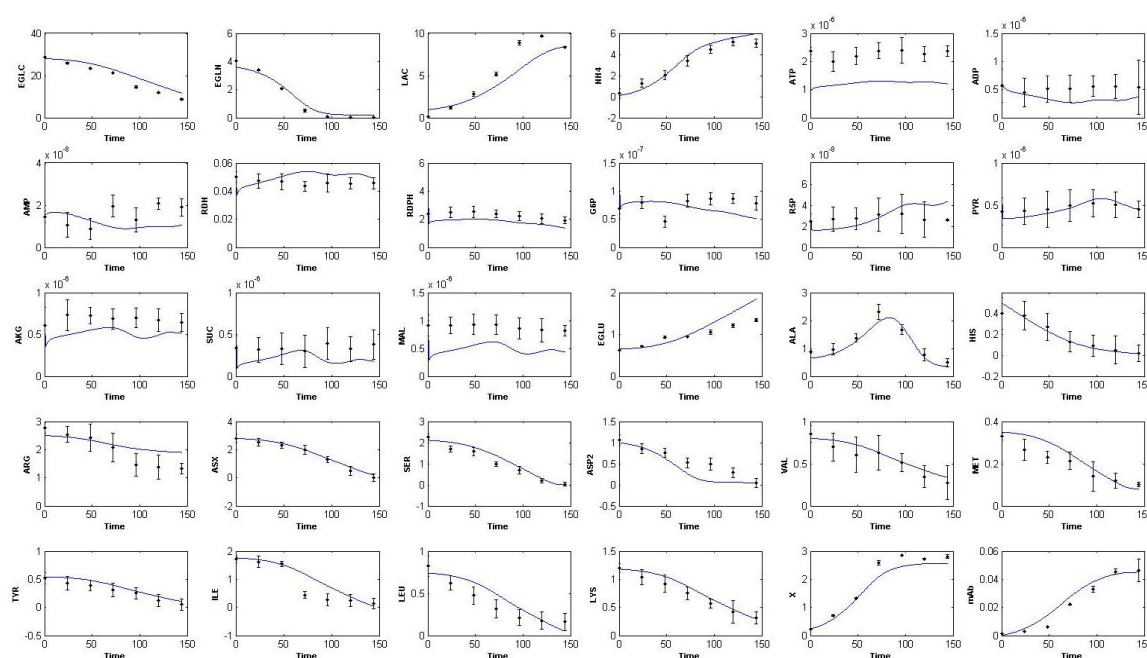


Figure 4-1 : Simulation du modèle avec les paramètres d'intérêts identifiés en utilisant la méthode des moindres carrés. Les valeurs expérimentales, tirées de Ghorbaniaghdam et al. (2013), sont représentées par des points et des barres d'erreur correspondantes.

Tableau 4-2 : Valeurs des cinq paramètres sélectionnés et leur intervalle de confiance respectif

Parametre	Valeur	Intervalle de confiance
Vmax_HK	$3,86.10^{-4} \text{ mmol.}(10^6\text{cells})^{-1}.\text{h}^{-1}$	$\pm 5,83.10^{-5} \text{ mmol.}(10^6\text{cells})^{-1}.\text{h}^{-1}$ (15.1%)
Vmax_growth	$4,80.10^{-1} \text{ h}^{-1}$	$\pm 4.80.10^{-2} \text{ h}^{-1}$ (16.5%)
Vmaxf_LDH	$3,29.10^{-4} \text{ mmol.}(10^6\text{cells})^{-1}.\text{h}^{-1}$	$\pm 4,72.10^{-5} \text{ mmol.}(10^6\text{cells})^{-1}.\text{h}^{-1}$ (14.4%)
Vmax_NADPHox	$4,12.10^{-3} \text{ mmol.}(10^6\text{cells})^{-1}.\text{h}^{-1}$	$\pm 4,73.10^{-4} \text{ mmol.}(10^6\text{cells})^{-1}.\text{h}^{-1}$ (11.5%)
Vmax_ATPase	$4,96.10^{-3} \text{ mmol.}(10^6\text{cells})^{-1}.\text{h}^{-1}$	$\pm 3,58.10^{-4} \text{ mmol.}(10^6\text{cells})^{-1}.\text{h}^{-1}$ (7.2%)

4.3 Planification expérimentale statique

L'étape suivante fut de décrire les expériences pouvant améliorer les intervalles de confiance des paramètres du modèle, en changeant de manière spécifique des conditions d'expérimentation et les garder constantes pendant toute la durée d'une expérience. Les deux seules modifications étudiées furent la valeur initiale de la glutamine extracellulaire (EGLN) présente dans le milieu et le niveau d'oxygène dissous. Comme indiqué précédemment, le déterminant de la matrice Hessienne a été utilisée comme une mesure de la confiance globale dans le modèle. Des variations de ce déterminant pour différentes valeurs de glutamine et d'oxygène sont représentés figure 4-2. Les résultats sont représentés en échelle logarithmique pour plus de clarté.

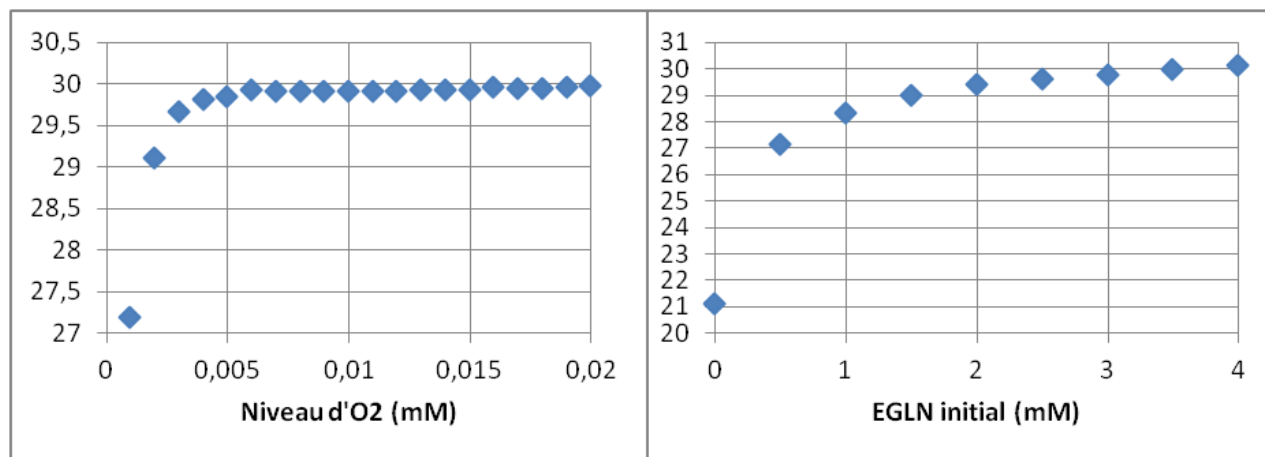


Figure 4-2 : L'évolution du déterminant de la matrice Hessienne en fonction de la valeur initiale de EGLN (gauche) et d'oxygène dissous (droite). Les abscisses sont en mM, les ordonnées sont sans unité.

Il apparaît évident que le déterminant de la matrice Hessienne croît avec la concentration en glutamine et en oxygène dissous, jusqu'à atteindre rapidement un plateau. Les valeurs nominales pour chaque paramètres se trouve dans les régions des plateaux correspondant. Il y a alors aucun intérêt à modifier ces deux variables et seront donc laissées à leur valeurs nominales de 0,22 mM pour l'oxygène dissous et 3,6 mM pour la glutamine.

4.4 Planification expérimentale dynamique - variation de l'oxygène dissous

Ghorbaniaghdam A. et al. (2014) avaient simulé une perturbation (hypoxie) du niveau d'oxygène pendant une culture de CHO en mode cuvée-alimentée, et avaient montré la formation de fluctuations des concentrations en métabolites et des paramètres énergétiques. De telles perturbations devraient engendrer une variation suffisante des données, et ainsi améliorer la précision de l'identification des paramètres. De plus, le niveau en oxygène est facilement contrôlable durant une expérience, en particulier si on veut couper l'apport en oxygène.

Le paramètre du modèle le plus important à considérer lors de ces perturbations du niveau d'oxygène est K_{O_2} - la constante d'affinité des cellules associée à l'oxygène. Il faut noter que tout les termes cinétiques du modèle se présentent sous la forme :

$$\frac{O_2}{K_{O_2} + O_2}$$

Cela signifie que n'importe quelle variation en O_2 au dessus de la valeur de K_{O_2} n'aurait presque aucun effet sur l'évolution du système, le plateau (i.e. à vitesse V_{max}) étant déjà atteint. Donc, pendant le processus de planification expérimentale, il est très important de penser à réduire l'oxygène en dessous de la valeur de K_{O_2} . C'est dans ce but que la prochaine section s'intéresse à l'identification de ce paramètre grâce à des tests de respiration.

4.4.1 Identifier K_{O_2} - tests de respiration

Un respiromètre précédemment développé dans et Lamboursain al. (2002) (se référer à la section matériel et méthode), a été utilisé pour observer l'évolution de la concentration en oxygène dissous (DO) en fonction du temps pendant une culture de cellules CHO. Les données ont été corrigées en fonction de la température variable, et lissées en utilisant les équations présentées dans la section matériel et méthodes. Pendant l'expérience, il n'y a pas d'apport en oxygène et le système évolue graduellement vers le mode hypoxique, puis anoxique. L'évolution de DO en fonction du temps est mesuré (figure 4-3-A), et de ces résultats la relation entre le taux de consommation en oxygène (OUR) et DO a été calculée (figure 4-3-B). Ces deux résultats sont représentés pour les cas d'une concentration cellulaire de 1.10^6 cellules/mL et une concentration initiale en oxygène de 20% (à saturation avec l'air à température ambiante) dans la figure 4-3. Cinq expériences de ce type ont été réalisées, deux fois chacune, avec différentes concentrations en cellules (0,5, 1,0 ou 2.10^6 cellules/mL) et différentes valeurs initiales d'oxygène dissous (10%, 20%, ou 40% de saturation avec l'air). La valeur de K_{O_2} a alors été trouvée à 5.10^{-3} mM en appliquant une régression sur l'ensemble des données et en utilisant l'équation :

$$OUR = OUR_{max} \frac{DO}{K_{O_2} + DO}$$

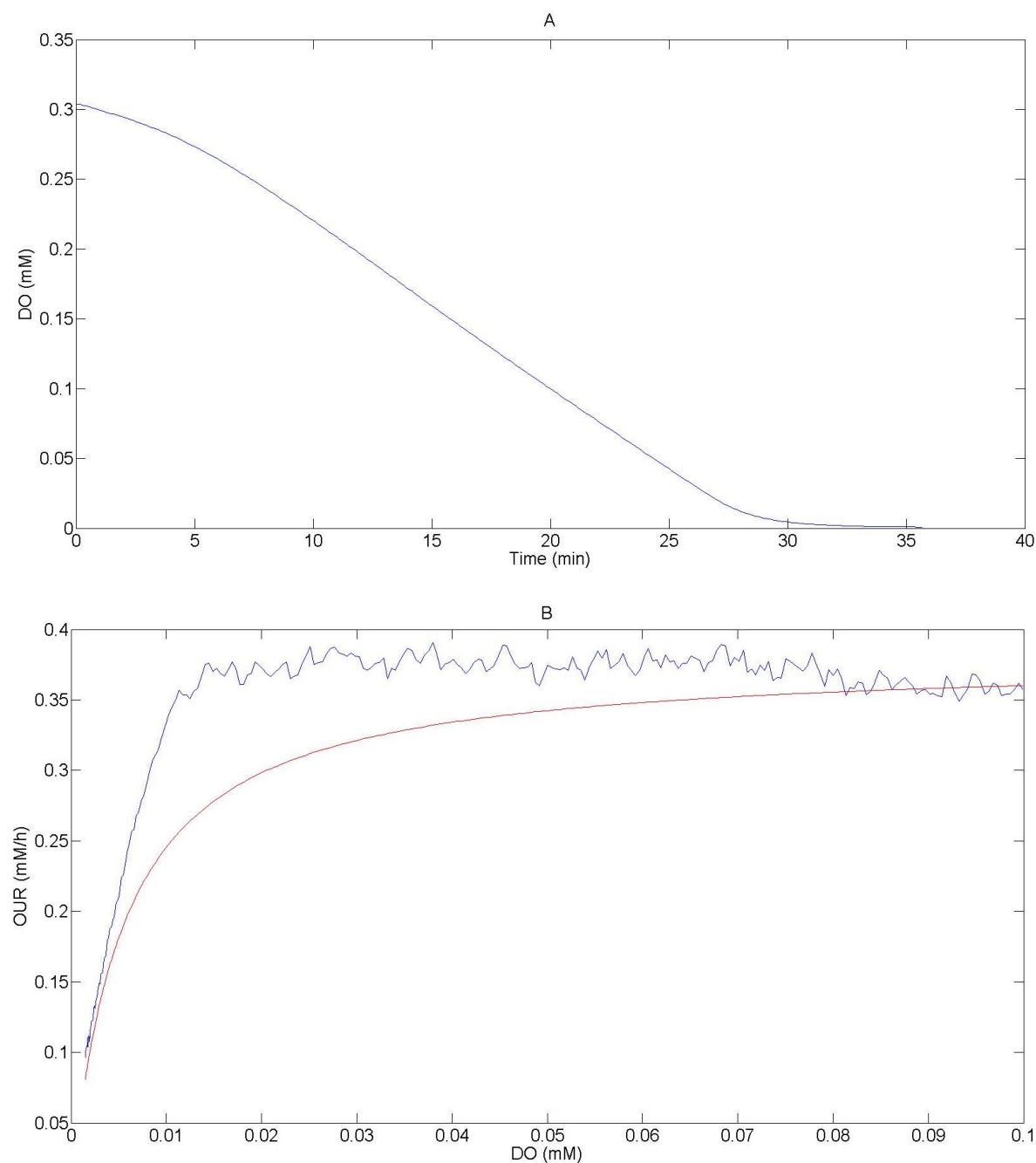


Figure 4-3 : Données expérimentales brutes des expériences de respiration (A) ; la ligne bleu représente l'évolution de DO (mM) en fonction du temps (minutes) ; et les valeurs calculées (B) ; la ligne bleu représente les valeurs calculées de OUR (mM/h) en fonction de DO (mM), la ligne rouge est la courbe de régression. Les deux graphes correspondent à l'expérience faite pour une concentration en cellule de 1.10^6 cellules/mL et un taux d'oxygène initial de 20%.

4.4.2 Viabilité cellulaire en absence ponctuelle d'oxygène

De la section précédente, on peut extraire le fait que la valeur de K_{O_2} n'est que d'environ 2.5% de la valeur nominal d' O_2 (0,22 mM). Donc, pour obtenir une variation dynamique importante, il est important de descendre en dessous de cette valeur. Le mieux est donc de couper l'alimentation en oxygène pendant une période donnée. Mais il n'est pas évident que les cellules resteront en vie pendant ces périodes d'hypoxie/anoxie. Pour vérifier cela une série d'expériences fut faite. Pour chacune d'elle une concentration en cellule de 1.10^6 cellules/mL a été utilisée. La viabilité cellulaire a été mesurée avant chaque expérience. La culture était ensuite placée dans le respiromètre et comme décrit précédemment, rentrait lentement en condition hypoxique (figure 4-3-A). A partir de ce point les cellules furent gardées en condition anoxique pendant une durée déterminée (15, 30, 45 ou 60 minutes). La viabilité des cellules CHO a été mesurée après chaque expérience (tableau 4-3)

Tableau 4-3 : Résultats des tests de viabilité avec une concentration cellulaire de 1.10^6 cellules/mL

Temps en hypoxie	Viabilité avant expérience		Viabilité après expérience	
	1 ^{er} duplicata	2 ^{ème} duplicata	1 ^{er} duplicata	2 ^{ème} duplicata
15 minutes	98%	99%	98%	99%
30 minutes	98%	99%	97%	98%
45 minutes	97%	98%	96%	98%
60 minutes	97%	96%	95%	94%

La viabilité cellulaire se maintient au-dessus de 95% même après une heure en condition hypoxique. De plus, la faible baisse de viabilité peut être attribuée aux forces de cisaillement dû au barreau magnétique du respiromètre (Lamboursain et al., 2002). Ces résultats confirment que les cellules CHO peuvent survivre dans un environnement sans oxygène suffisamment longtemps pour en mesurer les effets lors d'une culture cellulaire.

4.4.3 Planification expérimentale finale et résultats attendus

Les résultats précédents montrent qu'il est possible de couper l'apport en oxygène pendant un temps relativement court sans affecter significativement la viabilité cellulaire. L'étape suivante fut de déterminer le moment et la durée durant laquelle une telle coupure devait être imposée pour collecter des données intéressantes. Dans ce but une série de simulations ont été faites avec différentes valeurs de durée et du temps de coupure. A noter que le temps de la coupure n'est pas le même que celui passé en condition hypoxique, car l'oxygène doit d'abord être consommé avant d'atteindre une valeur nulle. La figure 4-4 montre que la durée optimale pour une coupure se situe autour de 4 heures. Cela donne suffisamment de temps pour l'oxygène dissous d'atteindre le zéro et pour le système de passer à un état différent ce qui donne plus d'informations pour l'identification des paramètres, comme le montre la valeur maximale du déterminant de la matrice Hessienne.

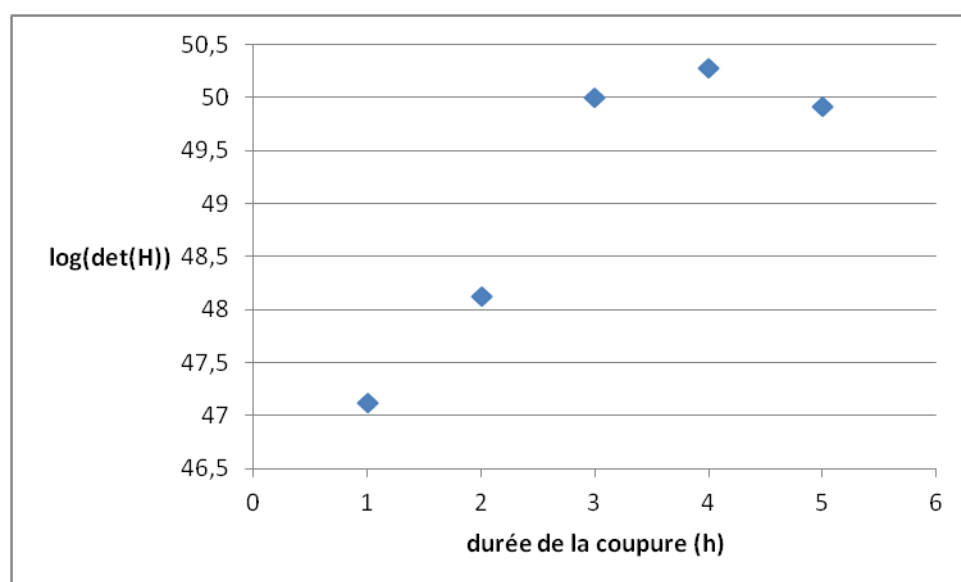


Figure 4-4 : Valeurs du déterminant de la matrice Hessienne en fonction de la durée de la coupure en oxygène. Chaque point est la moyenne de 10 points pris à des moments effectifs de la coupure différent.

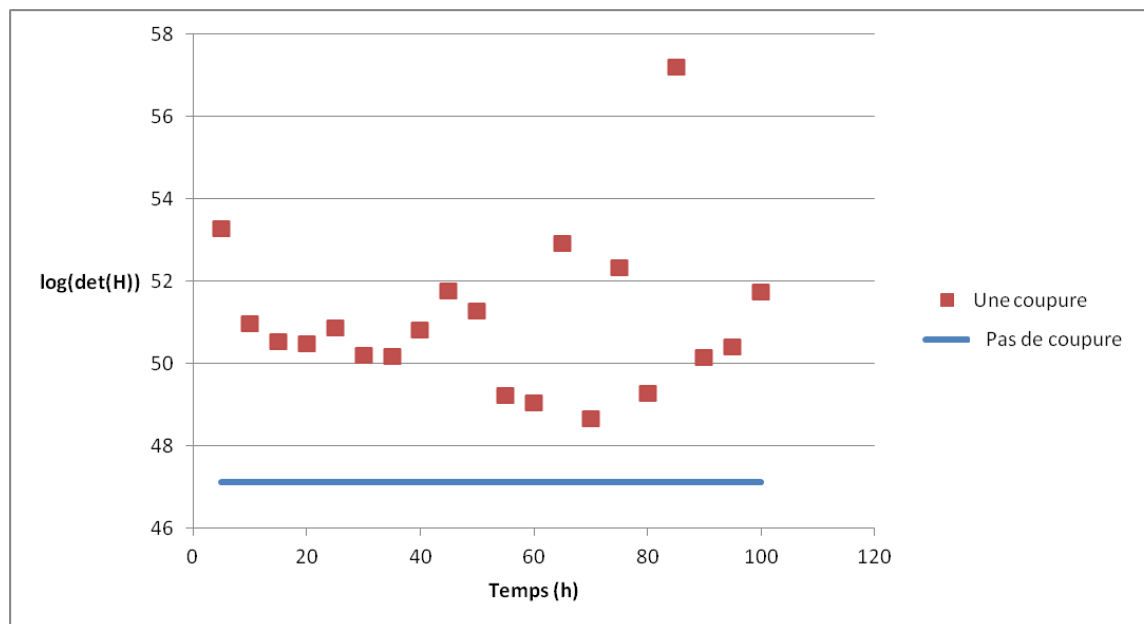


Figure 4-5 : Valeurs du déterminant de la matrice Hessienne de la fonction de coût, sans unité, en relation avec le temps de commencement de la coupure, en heure, comparé à la valeur sans coupure.

À partir des résultats (figure 4-5), par analyse de l'influence du temps de début de la coupure d'oxygène, il apparaît que ce temps n'est pas un facteur déterminant, mais que la présence seule de la coupure suffit pour obtenir une amélioration, i.e. une augmentation du déterminant, pour chacun des valeurs testées. Pour la suite, la valeur à 85h a été choisie, car elle se présente comme la plus grande valeur obtenue, et le fait qu'elle se situe pendant la phase de croissance exponentielle est un bon choix pour causer une perturbation suffisante. Les intervalles de confiance sont alors recalculé, en prenant en compte les erreurs expérimentales et de simulations, ainsi que le nombre de points de mesure. Il est à noter qu'au moins deux points de mesure pendant les dynamiques causées par la coupure sont nécessaires. Le tableau 4-4 présente les intervalles de confiance avec et sans la présence d'une coupure d'oxygène. Les valeurs sont classées en fonction de l'amélioration provoquée par la coupure.

Tableau 4-4 : Les intervalles de confiance en pourcentage, pour chacun des cinq paramètres sélectionnés. La valeur initiale, sans coupure, est comparée à celle avec une coupure d'oxygène à 85h.

Parametre	Sans coupure	Avec une coupure
Vmax_HK	15.1%	4.7%
Vmax_growth	16.5%	5.2%
Vmaxf_LDH	14.4%	8.3%
Vmax_NADPox	11.5%	6.7%
Vmax_ATPase	7.2%	5.8%

Ces résultats montrent alors que les intervalles de confiance pour l'ensemble des cinq paramètres sont diminués et donc amélioré par la présence d'une coupure. *Vmax_HK* et *Vmax_growth* sont ceux qui présentent les meilleurs améliorations et les plus petits intervalles de confiance. Ils représentent respectivement le début et la fin du réseau métabolique considéré (voir figure 3-1). *Vmax_NADPHox* et *Vmaxf_LDH* sont aussi amélioré mais de moindre mesure. Finalement, *Vmax_ATPase*, bien qu'ayant un petit intervalle de confiance au départ, n'obtient qu'une faible amélioration. Ceci peut être expliquer par le fait que *Vmax_ATPase* est inclut dans une réaction simplifiée regroupant plus de réactions.

CHAPITRE 5 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Ce mémoire avait pour but de présenter le travail effectué relatif à une planification expérimentale basée sur le modèle précédemment développé par notre équipe. La première étape d'indentification des paramètres d'intérêt a révélé que les étapes extrêmes et les réactions énergétiques prennent une place particulièrement importante dans une bonne modélisation du métabolisme cellulaire. Par la suite une première étude indique qu'une expérience ne jouant que sur les paramètres d'entrée ne donne que de piètre résultats. Il est nécessaire de contrôler l'environnement de la cellule sur toute la durée d'une expérience. Ici le travail s'est concentré sur l'oxygène, très facile à manipuler en bioréacteur quel que soit le mode de culture. Les tests respiratoires ont alors indiqué la haute affinité des cellules CHO à l'oxygène et leur haute résistance à un milieu hypoxique. Une coupure permet alors d'obtenir des données intéressantes pour l'amélioration du modèle comme l'a montrée la planification expérimentale finale. En effet, une coupure d'environ quatre heures permet aux cellules de consommer l'oxygène encore dissous dans le milieu, puis de rentrer en phase hypoxique avec un minimum de pertes cellulaires. Une telle coupure effectuée pendant la phase exponentielle présente les meilleurs résultats, une perturbation pendant cette phase très active permet de plus grandes variations du comportement et donc présente un grand intérêt dans l'amélioration de l'acuité du modèle. L'erreur sur les paramètres sélectionnés sera réduite de deux à trois fois avec une telle expérience.

Le travail effectué ici présente une expérience possible pour améliorer notre confiance dans notre modèle. L'identification des paramètres sur ces nouvelles données doit permettre de modéliser un comportement normal et de prédire le comportement cellulaire dans différentes conditions. D'autres planifications expérimentales sur d'autres paramètres de contrôle permettront alors de confirmer que le modèle prédit déjà de manière précise différents comportements cellulaires, ou révélera des cas qui permettront d'en améliorer la confiance. De plus, ce mémoire a montré la très grande importance des réactions énergétiques de la cellule, qui sont parmi les plus intriquées du métabolisme et les plus simplement modélisée dans notre modèle du cycle du carbone. Une étude plus poussée sur l'influence de l'ATP et du cycle des pentose-phosphate pourrait révéler de nouvelles voies d'amélioration de la production cellulaire. Il faut bien sûr prendre en compte le fait qu'une complexification du modèle augmente le nombre de paramètres à identifier et augmente de ce fait l'erreur d'identification sur ces derniers. Il est possible aussi

d'envisager d'étudier les cellules en mode cuvée alimentée, ce qui permet un meilleur contrôle de leur milieu et donc augmente considérablement les points d'appui possibles pour une planification expérimentale.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdalah, R., Wei, L., Francis, K., & Yu, S. P. (2006). Valinomycin-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *Neuroscience letters*, 405(1), 68-73.
- Ahn, W. S., & Antoniewicz, M. R. (2011). Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metabolic engineering*, 13(5), 598-609.
- Ahn, W. S., & Antoniewicz, M. R. (2012). Towards dynamic metabolic flux analysis in CHO cell cultures. *Biotechnology journal*, 7(1), 61-74.
- Ailor, E., Takahashi, N., Tsukamoto, Y., Masuda, K., Rahman, B. A., Jarvis, D. L., ... & Betenbaugh, M. J. (2000). N-glycan patterns of human transferrin produced in *Trichoplusia ni* insect cells: effects of mammalian galactosyltransferase. *Glycobiology*, 10(8), 837-847.
- Antoniewicz, M. R. (2013). Dynamic metabolic flux analysis—tools for probing transient states of metabolic networks. *Current opinion in biotechnology*, 24(6), 973-978.
- Asaff, A., Escobar, F., & de la Torre, M. (2009). Culture medium improvement for *Isaria fumosorosea* submerged conidia production. *Biochemical Engineering Journal*, 47(1), 87-92.
- Atkinson, A. C., & Bogacka, B. (2002). Compound and other optimum designs for systems of nonlinear differential equations arising in chemical kinetics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 61(1), 17-33.
- Badsha, M. B., Kurata, H., Onitsuka, M., Oga, T., & Omasa, T. (2016). Metabolic analysis of antibody producing Chinese hamster ovary cell culture under different stresses conditions. *Journal of bioscience and bioengineering*, 122(1), 117-124.
- Baldi, L., Muller, N., Picasso, S., Jacquet, R., Girard, P., Thanh, H. P., ... & Wurm, F. M. (2005). Transient Gene Expression in Suspension HEK-293 Cells: Application to Large-Scale Protein Production. *Biotechnology progress*, 21(1), 148-153.
- Bayrak, E. S., Wang, T., Cinar, A., & Undey, C. (2015). Computational Modeling of Fed-Batch Cell Culture Bioreactor: Hybrid Agent-Based Approach. *IFAC-PapersOnLine*, 48(8), 1252-1257.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Glycolysis and gluconeogenesis.
- Boghigian, B. A., Seth, G., Kiss, R., & Pfeifer, B. A. (2010). Metabolic flux analysis and pharmaceutical production. *Metabolic engineering*, 12(2), 81-95.

- Brown, A. J., & James, D. C. (2015). Precision control of recombinant gene transcription for CHO cell synthetic biology. *Biotechnology advances*.
- Chassagnole, C., Noisommit-Rizzi, N., Schmid, J. W., Mauch, K., & Reuss, M. (2002). Dynamic modeling of the central carbon metabolism of Escherichia coli. *Biotechnology and bioengineering*, 79(1), 53-73.
- Chen, R. (2012). Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond. *Biotechnology advances*, 30(5), 1102-1107.
- Chitnis, N., Hyman, J. M., & Cushing, J. M. (2008). Determining important parameters in the spread of malaria through the sensitivity analysis of a mathematical model. *Bulletin of mathematical biology*, 70(5), 1272-1296.
- Chu, L., & Robinson, D. K. (2001). Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), 180-187.
- Cloutier, M., Perrier, M., & Jolicoeur, M. (2007). Dynamic flux cartography of hairy roots primary metabolism. *Phytochemistry*, 68(16), 2393-2404.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W., & Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(11), 3240-3244.
- D'Apuzzo, M., D'Arco, M., & Pasquino, N. (2011). Design of experiments and data-fitting techniques applied to calibration of high-frequency electromagnetic field probes. *Measurement*, 44(6), 1153-1165.
- Dermol, J., & Miklavčič, D. (2014). Predicting electroporation of cells in an inhomogeneous electric field based on mathematical modeling and experimental CHO-cell permeabilization to propidium iodide determination. *Bioelectrochemistry*, 100, 52-61.
- Dersch, L. M., Beckers, V., & Wittmann, C. (2016). Green pathways: metabolic network analysis of plant systems. *Metabolic engineering*, 34, 1-24.
- Edwards, J. S., & Palsson, B. O. (2000). Metabolic flux balance analysis and the in silico analysis of Escherichia coli K-12 gene deletions. *BMC bioinformatics*, 1(1), 1.
- Farooq, M. A., Nóvoa, H., Araújo, A., & Tavares, S. M. (2015). An innovative approach for planning and execution of pre-experimental runs for Design of Experiments. *Investigaciones Europeas de Dirección y Economía de la Empresa*.
- Ferrer-Mirallès, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J. L., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial cell factories*, 8(1), 1.

- Fischer, S., Handrick, R., & Otte, K. (2015). The art of CHO cell engineering: a comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnology advances*, 33(8), 1878-1896.
- Fox, S., & Decisions, H. B. (2004). Maximizing outsourced biopharma production. *Contract Pharma*, 6, 72-78.
- Gerber, D. E. (2008). Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *Am Fam Physician*, 77(3), 311-319.
- Ghaderi, D., Zhang, M., Hurtado-Ziola, N., & Varki, A. (2012). Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 28(1), 147-176.
- Ghorbaniaghdam, A., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2010). A kinetic modelling approach to study the role of energy regulatory pathways in CHO cells. *IFAC Proceedings Volumes*, 43(6), 479-484.
- Ghorbaniaghdam, A. (2013). *Development of a Dynamic Model to Describe CHO cells Metabolic Network and Regulation* (Doctoral dissertation, École Polytechnique de Montréal).
- Ghorbaniaghdam, A., Chen, J., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2014). Analyzing clonal variation of monoclonal antibody-producing CHO cell lines using an in silico metabolomic platform. *PloS one*, 9(3), e90832.
- Ghorbaniaghdam, A., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2013). A kinetic-metabolic model based on cell energetic state: study of CHO cell behavior under Na-butyrate stimulation. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(4), 469-487.
- Ghorbaniaghdam, A., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2014). An in-silico study of the regulation of CHO cells glycolysis. *Journal of theoretical biology*, 357, 112-122.
- Gnaiger, E., Steinlechner-Maran, R., Méndez, G., Eberl, T., & Margreiter, R. (1995). Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 27(6), 583-596.
- Golabgir, A., Gutierrez, J. M., Hefzi, H., Li, S., Palsson, B. O., Herwig, C., & Lewis, N. E. (2016). Quantitative feature extraction from the Chinese hamster ovary bioprocess bibliome using a novel meta-analysis workflow. *Biotechnology advances*.
- Gopalakrishnan, S., & Maranas, C. D. (2015). ¹³C metabolic flux analysis at a genome-scale. *Metabolic Engineering*, 32, 12-22.
- Goudar, C., Biener, R., Boisart, C., Heidemann, R., Piret, J., de Graaf, A., & Konstantinov, K. (2010). Metabolic flux analysis of CHO cells in perfusion culture by metabolite balancing and 2D [¹³C, ¹H] COSY NMR spectroscopy. *Metabolic engineering*, 12(2), 138-149.

- Grillari, J., Fortschegger, K., Grabherr, R. M., Hohenwarter, O., Kunert, R., & Katinger, H. (2001). Analysis of alterations in gene expression after amplification of recombinant genes in CHO cells. *Journal of biotechnology*, 87(1), 59-65.
- Hacker, D. L., De Jesus, M., & Wurm, F. M. (2009). 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells—where do we go from here?. *Biotechnology advances*, 27(6), 1023-1027.
- Hagrot, E., Oddsdóttir, H. Æ., Hosta, J. G., Jacobsen, E. W., & Chotteau, V. (2016). Poly-pathway model, a novel approach to simulate multiple metabolic states by reaction network-based model—Application to amino acid depletion in CHO cell culture. *Journal of biotechnology*, 228, 37-49.
- Ho, S. C., Nian, R., Woen, S., Chng, J., Zhang, P., & Yang, Y. (2016). Impact of hydrolysates on monoclonal antibody productivity, purification and quality in Chinese hamster ovary cells. *Journal of bioscience and bioengineering*.
- Hunter, W. G., Hill, W. J., & Henson, T. L. (1969). Designing experiments for precise estimation of all or some of the constants in a mechanistic model. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 47(1), 76-80.
- Ivetić, D. Ž., Šćiban, M. B., & Antov, M. G. (2012). Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar beet shreds: Statistical modeling of the experimental results. *Biomass and bioenergy*, 47, 387-394.
- Jackson, D. A., Symons, R. H., & Berg, P. (1972). Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(10), 2904-2909.
- Jayapal, K. P., Wlaschin, K. F., Hu, W., & Yap, M. G. (2007). Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chemical Engineering Progress*, 103(10), 40.
- Jefferis, R. (2005). Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnology Progress*, 21(1), 11-16.
- Jeong, D. W., Kim, T. S., Cho, I. T., & Kim, I. Y. (2004). Modification of glycolysis affects cell sensitivity to apoptosis induced by oxidative stress and mediated by mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications*, 313(4), 984-991.
- Kauffman, K. J., Prakash, P., & Edwards, J. S. (2003). Advances in flux balance analysis. *Current opinion in biotechnology*, 14(5), 491-496.
- Kim, J. Y., Kim, Y. G., & Lee, G. M. (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(3), 917-930.

- Kinch, M. S. (2015). An overview of FDA-approved biologics medicines. *Drug discovery today*, 20(4), 393-398.
- Kishishita, S., Katayama, S., Kodaira, K., Takagi, Y., Matsuda, H., Okamoto, H., ... & Aoyagi, H. (2015). Optimization of chemically defined feed media for monoclonal antibody production in Chinese hamster ovary cells. *Journal of bioscience and bioengineering*, 120(1), 78-84.
- Kuystermans, D., & Al-Rubeai, M. (2015). Biopharmaceutical Products from Animal Cell Culture. In *Animal Cell Culture* (pp. 717-757). Springer International Publishing.
- Lamboursain, L., St-Onge, F., & Jolicoeur, M. (2002). A Lab-Built Respirometer for Plant and Animal Cell Culture. *Biotechnology progress*, 18(6), 1377-1386.
- Lauersen, K. J., Huber, I., Wichmann, J., Baier, T., Leiter, A., Gaukel, V., ... & Posten, C. (2015). Investigating the dynamics of recombinant protein secretion from a microalgal host. *Journal of biotechnology*, 215, 62-71.
- Lee, K. H., Tsutsui, T., Honda, K., Asano, R., Kumagai, I., Ohtake, H., & Omasa, T. (2013). Generation of high-producing cell lines by overexpression of cell division cycle 25 homolog A in Chinese hamster ovary cells. *Journal of bioscience and bioengineering*, 116(6), 754-760.
- Leighty, R. W., & Antoniewicz, M. R. (2013). COMPLETE-MFA: complementary parallel labeling experiments technique for metabolic flux analysis. *Metabolic engineering*, 20, 49-55.
- Lillacci, G., & Khammash, M. (2010). Parameter estimation and model selection in computational biology. *PLoS Comput Biol*, 6(3), e1000696.
- Liu, Y., Zhang, W., Deng, X., Poon, H. F., Liu, X., Tan, W. S., ... & Fan, L. (2015). Chinese hamster ovary cell performance enhanced by a rational divide-and-conquer strategy for chemically defined medium development. *Journal of bioscience and bioengineering*, 120(6), 690-696.
- Loignon, M., Perret, S., Kelly, J., Boulais, D., Cass, B., Bisson, L., ... & Durocher, Y. (2008). Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN α 2b in HEK293 cells. *BMC biotechnology*, 8(1), 1.
- Long, C. P., Au, J., Gonzalez, J. E., & Antoniewicz, M. R. (2016). ¹³C metabolic flux analysis of microbial and mammalian systems is enhanced with GC-MS measurements of glycogen and RNA labeling. *Metabolic Engineering*, 38, 65-72.
- Martínez, V. S., Buchsteiner, M., Gray, P., Nielsen, L. K., & Quek, L. E. (2015). Dynamic metabolic flux analysis using B-splines to study the effects of temperature shift on CHO cell metabolism. *Metabolic Engineering Communications*, 2, 46-57.

- Masuda, K., Furumitsu, M., Taniuchi, S., Iwakoshi-Ukena, E., & Ukena, K. (2015). Production and characterization of neurosecretory protein GM using *Escherichia coli* and Chinese Hamster Ovary cells. *FEBS open bio*, 5(1), 844-851.
- Meshram, M., Wei, Y. Y., Naderi, S., McConkey, B., Ingalls, B., Budman, H., & Scharer, J. (2010). Modeling the progression of apoptosis in Chinese Hamster Ovary cells. *IFAC Proceedings Volumes*, 43(6), 467-472.
- Morris, M. D. (1991). Factorial sampling plans for preliminary computational experiments. *Technometrics*, 33(2), 161-174.
- Mulukutla, B. C., Khan, S., Lange, A., & Hu, W. S. (2010). Glucose metabolism in mammalian cell culture: new insights for tweaking vintage pathways. *Trends in biotechnology*, 28(9), 476-484.
- Nicolae, A., Wahrheit, J., Bahnemann, J., Zeng, A. P., & Heinzle, E. (2014). Non-stationary ¹³C metabolic flux analysis of Chinese hamster ovary cells in batch culture using extracellular labeling highlights metabolic reversibility and compartmentation. *BMC systems biology*, 8(1), 1.
- Nolan, R. P., & Lee, K. (2011). Dynamic model of CHO cell metabolism. *Metabolic engineering*, 13(1), 108-124.
- Nolan, R. P., & Lee, K. (2012). Dynamic model for CHO cell engineering. *Journal of biotechnology*, 158(1), 24-33.
- Okumura, T., Masuda, K., Watanabe, K., Miyadai, K., Nonaka, K., Yabuta, M., & Omasa, T. (2015). Efficient enrichment of high-producing recombinant Chinese hamster ovary cells for monoclonal antibody by flow cytometry. *Journal of bioscience and bioengineering*, 120(3), 340-346.
- Onitsuka, M., Kawaguchi, A., Asano, R., Kumagai, I., Honda, K., Ohtake, H., & Omasa, T. (2014). Glycosylation analysis of an aggregated antibody produced by Chinese hamster ovary cells in bioreactor culture. *Journal of bioscience and bioengineering*, 117(5), 639-644.
- Park, S., Ng, H. K. T., & Chan, P. S. (2015). On the Fisher information and design of a flexible progressive censored experiment. *Statistics & Probability Letters*, 97, 142-149.
- Pozo, C., Miró, A., Guillén-Gosálbez, G., Sorribas, A., Alves, R., & Jiménez, L. (2015). Global optimization of hybrid kinetic/FBA models via outer-approximation. *Computers & Chemical Engineering*, 72, 325-333.
- Quek, L. E., Dietmair, S., Krömer, J. O., & Nielsen, L. K. (2010). Metabolic flux analysis in mammalian cell culture. *Metabolic Engineering*, 12(2), 161-171.

- Richelle, A., Gziri, K. M., & Bogaerts, P. (2016). A methodology for building a macroscopic FBA-based dynamical simulator of cell cultures through flux variability analysis. *Biochemical Engineering Journal*, 114, 50-61.
- Rios-Esteva, R., & Lange, B. M. (2007). Experimental and mathematical approaches to modeling plant metabolic networks. *Phytochemistry*, 68(16), 2351-2374.
- Robitaille, J., Chen, J., & Jolicoeur, M. (2015). A Single Dynamic Metabolic Model Can Describe mAb Producing CHO Cell Batch and Fed-Batch Cultures on Different Culture Media. *PloS one*, 10(9), e0136815.
- Rodgers, K. R., & Chou, R. C. (2016). Therapeutic monoclonal antibodies and derivatives: Historical perspectives and future directions. *Biotechnology Advances*.
- Romero-Villafranca, R., Zúnica, L., & Romero-Zúnica, R. (2007). Ds-optimal experimental plans for robust parameter design. *Journal of Statistical planning and inference*, 137(4), 1488-1495.
- Saltelli, A., Ratto, M., Andres, T., Campolongo, F., Cariboni, J., Gatelli, D., ... & Tarantola, S. (2008). *Global sensitivity analysis: the primer*. John Wiley & Sons.
- Sanchez-Garcia, L., Martín, L., Mangués, R., Ferrer-Miralles, N., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2016). Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microbial cell factories*, 15(1), 1.
- Shraga, Y., & Tewarson, R. P. (1990). Parameter estimation in underdetermined problems. *Computers & Mathematics with Applications*, 20(4-6), 325-337.
- Stephanopoulos, G. (1999). Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metabolic engineering*, 1(1), 1-11.
- Teo, T. A., & Cho, K. H. (2016). BIM-oriented indoor network model for indoor and outdoor combined route planning. *Advanced Engineering Informatics*, 30(3), 268-282.
- Tjio, J. H., & Puck, T. T. (1958). Genetics of somatic mammalian cells: II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *The Journal of experimental medicine*, 108(2), 259.
- Toussaint, C., Henry, O., & Durocher, Y. (2016). Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures. *Journal of biotechnology*, 217, 122-131.
- Trinh, C. T., Wlaschin, A., & Sreenc, F. (2009). Elementary mode analysis: a useful metabolic pathway analysis tool for characterizing cellular metabolism. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(5), 813-826.
- Tsao, Y. S., Cardoso, A. G., Condon, R. G. G., Voloch, M., Lio, P., Lagos, J. C., ... & Liu, Z. (2005). Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism. *Journal of biotechnology*, 118(3), 316-327.

- Vacanti, N. M., & Metallo, C. M. (2013). Exploring metabolic pathways that contribute to the stem cell phenotype. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(2), 2361-2369.
- Varner, J., & Ramkrishna, D. (1999). Mathematical models of metabolic pathways. *Current opinion in Biotechnology*, 10(2), 146-150.
- Wahrheit, J., Niklas, J., & Heinzle, E. (2014). Metabolic control at the cytosol–mitochondria interface in different growth phases of CHO cells. *Metabolic engineering*, 23, 9-21.
- Wiechert, W. (2001) ¹³C Metabolic Flux Analysis. *Metabolic Engineering* 3, 195-206 (2001)
- Wiens, D.P. (2015) Optimal Design for Nonlinear and Spatial Models: Introduction and Historical Overview. Dean, A., Morris, M., Stufken, J., & Bingham, D. (Eds.). (2015). *Handbook of Design and Analysis of Experiments* (Vol. 7). CRC Press.
- Wilson, D. F., Rumsey, W. L., Green, T. J., & Vanderkooi, J. (1988). The oxygen dependence of mitochondrial oxidative phosphorylation measured by a new optical method for measuring oxygen concentration. *Journal of Biological Chemistry*, 263(6), 2712-2718.
- Wong, W. K. (1994). Comparing robust properties of A, D, E and G-optimal designs. *Computational statistics & data analysis*, 18(4), 441-448.
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature biotechnology*, 22(11), 1393-1398.
- Yamano, N., Takahashi, M., Haghighparast, S. M. A., Onitsuka, M., Kumamoto, T., Frank, J., & Omasa, T. (2016). Increased recombinant protein production owing to expanded opportunities for vector integration in high chromosome number Chinese hamster ovary cells. *Journal of bioscience and bioengineering*.
- Yang, S. T., Liu, X., & Zhang, Y. (2011). . Metabolic Engineering—Applications, Methods, and Challenges. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources: New Technologies and Applications*, 73.
- Zamorano, F., Wouwer, A. V., & Bastin, G. (2010). A detailed metabolic flux analysis of an underdetermined network of CHO cells. *Journal of biotechnology*, 150(4), 497-508.
- Zamorano, F., Wouwer, A. V., & Bastin, G. (2010). Metabolic flux analysis of CHO-320 cells: undetermined network and effect of measurement errors. *IFAC Proceedings Volumes*, 43(6), 437-442.
- Zamorano, F., Wouwer, A. V., Jungers, R. M., & Bastin, G. (2013). Dynamic metabolic models of CHO cell cultures through minimal sets of elementary flux modes. *Journal of biotechnology*, 164(3), 409-422.

Zhao, L., Zhang, H., Wang, L., Chen, H., Chen, Y. Q., Chen, W., & Song, Y. (2015). 13 C-metabolic flux analysis of lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Bioresource technology*, 197, 23-29.

<http://www.statcan.gc.ca/pub/82-625-x/2014001/article/11896-eng.htm>

ANNEXE A - TESTS DE RESPIRATION - CORRECTION DE TEMPERATURE

Pendant les tests de respiration avec le kit développé par notre équipe (Lamboursain et al., 2002), il a été observé que la température suivait un cycle. La température a alors été relevée grâce à une sonde. La mesure en oxygène dissous étant établie grâce à une réaction, il a été supposé que cette dernière suivait une équation d'Arrhenius d'ordre 1 avec l'oxygène comme seul substrat, et le taux de réaction peut être alors écrit :

$$k = A_0 [O_2] e^{\frac{-E}{RT}}$$

Avec A_0 le facteur pre-exponentiel et E l'énergie d'activation. Nos données collectées ont alors été linéarisées pour calculer A_0 et E , et à partir de leurs valeurs une correction de température a pu être faite sur les données de l'oxygène dissous.